



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

TERAPÊUTICA COM INTERFERÃO- ω EM GATOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E/OU PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA: AVALIAÇÃO CLÍNICA, ANÁLISES LABORATORIAIS E EXCREÇÃO DE VÍRUS CONCOMITANTES DO TRACTO DIGESTIVO

INÊS RIBEIRO PEREIRA SIBORRO AZEVEDO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**TERAPÊUTICA COM INTERFERÃO- ω EM GATOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E/OU PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA: AVALIAÇÃO CLÍNICA,
ANÁLISES LABORATORIAIS E EXCREÇÃO DE VÍRUS CONCOMITANTES DO TRACTO
DIGESTIVO**

INÊS RIBEIRO PEREIRA SIBORRO AZEVEDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2011

LISBOA

Para as minhas avós Gracinda e Maria José,
a quem não foi dada oportunidade de irem além da quarta classe,
mas que educaram várias gerações de mulheres empreendedoras.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação encerra o meu primeiro grande ciclo de estudos que culmina em me tornar médica veterinária, o sonho da minha vida.

Para isso tenho de agradecer a toda a minha família pelo apoio e força que sempre me deram, destaco a minha Mãe que me aprou sempre que eu achava que não ia conseguir e que nunca me permitiu desistir. Já o meu Pai, os meus Avós paternos e o meu tio António tiveram um papel essencial em manter-me estimulada para conseguir o melhor préstimo ao longo destes 19 anos de escolaridade. Aos meus Avós maternos e a todos os meus tios por nunca terem duvidado de mim e por me manterem animada.

Quero sobretudo agradecer aos animais que foram cruzando a minha vida, foi por eles que sempre me esforcei ao máximo, para um dia os poder ajudar ao máximo, para saber qual a melhor opção e para evitar o seu sofrimento que é tão grande num país em que os animais são vistos como menos valor do que os objetos.

Esta dissertação só foi possível devido ao apoio incondicional, sabedoria e orientação da Doutora Solange Gil e da Doutora Ana Duarte, a quem devo o meu profundo agradecimento. Agradeço também ao Rodolfo Leal, à Clara Cartaxeiro e à Joana Cravo com quem partilhei o laboratório, as arranhadelas de gatos e a mesa de um restaurante de *fast-food*, após as esgotantes idas à União Zoófila, a quem agradeço igualmente por ter permitido este trabalho.

Por último, agradeço ao Tremoço, o gato 12 deste estudo que me divertiu e me deu tantos mimos cada vez que me deslocava à União Zoófila nos 5 meses de estágio.

RESUMO

Terapêutica com interferão- ω em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina e/ou pelo vírus da leucemia felina: avaliação clínica, análises laboratoriais e excreção de vírus concomitantes do trato digestivo

Os interferões são as proteínas da inflamação mais bem estudadas, encontram-se no mercado dois tipos de interferão: o interferão recombinante humano alfa (reHuIFN- α) e o interferão recombinante felino ómega (reFeIFN- ω). Ambos podem ser usados no tratamento dos sintomas das duas retrovíroses felinas, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV), duas doenças infecto-contagiosas de importante expressão na prática clínica, que afectam fortemente o estado hígido dos animais infectados e que, até ao momento, não tem cura. O reHuIFN- α encontrasse no mercado a um preço acessível, no entanto, a rápida produção de anticorpos levou à criação do reFeIFN- ω , específico para a espécie felina. O reHuIFN- ω já mostrou a sua eficácia, *in vitro*, contra o FIV, FeLV e coronavírus felino (FCoV), entre outros vírus que afectam estes animais. Com o objectivo de estudar os efeitos deste interferão em gatos naturalmente infectados e que ainda não estejam numa fase terminal da doença, assim como da excreção de vírus concomitantes do tracto digestivo, foram avaliados os seguintes parâmetros: sinais clínicos, hemograma, análises bioquímicas, proteinograma, carga de provírus de FeLV e excreção de FCoV e o vírus da panleucopénia felina (FPV) nas fezes. Foi administrado reFeIFN- ω a 16 gatos (7 FIV, 6 FeLV e 3 co-infectados) alojados num abrigo para gatos em Lisboa; seguiu-se o protocolo licenciado para este produto – 3 ciclos de 5 injeções, 1MU/Kg, SID, SC – foram feitas as colheitas de sangue e fezes nos dias 0, 10, 30 e 65. Houve uma melhoria dos sinais clínicos em 10/16 gatos, uma manutenção em 5/16 gatos e 1/16 gato piorou os seus sinais clínicos. Nos gatos infectados com FeLV 2/6 gatos diminuíram a sua carga de provírus, 1/6 aumentou e os restantes mantiveram, nos gatos co-infectados 1/3 gatos diminuiu e os restantes mantiveram a carga de provírus de FeLV. Apenas se detectou a presença de FPV num gato ao Dia 0, sendo que no Dia 65 não foi detectada a presença de FPV em nenhum animal. A carga de FCoV diminuiu em 7/16. Os resultados do proteinograma demonstram um efeito modelador vantajoso sobre o Sistema Imunitário (SI) e não se verificaram efeitos secundários ao nível do hemograma e parâmetros bioquímicos renais e hepáticos. O reFeIFN- ω mostrou-se vantajoso no controlo dos sinais clínicos provocados pelo FIV e/ou FeLV, assim como no controlo dos vírus concomitantes do tracto digestivo.

Palavras-chave: interferão ómega recombinante felino (reFeIFN- ω); vírus da imunodeficiência felina (FIV); vírus da leucemia felina (FeLV); sinais clínicos.

ABSTRACT

Interferon- ω therapeutic in feline immunodeficiency virus and/or feline leukaemia virus infected cats: clinical evaluation, laboratory analysis and gastro-intestinal concomitant virus excretion

Interferons are the most studied of the inflammatory proteins, there are two types of interferons in the market: human recombinant interferon alpha (reHuIFN- α) and feline recombinant interferon omega (reFeIFN- ω). They are both used in symptomatic treatment of feline immunodeficiency virus (FIV) and in feline leukaemia virus (FeLV) infected cats. These viral infections are very common in veterinary practice, inducing severe health debilitation and there is no cure for them. The low price of reHuIFN- α is an advantage, but its repeated use may cause fast antibody stimulation, so reFeIFN- ω , which is cat specific, was created to avoid this problem. reFeIFN- ω showed to be efficient, *in vitro*, against FIV, FeLV and feline coronavirus (FCoV) and other feline virus. The purpose of this study was to evaluate the Interferon omega effect in natural infected cats, not in a terminal phase, and the concomitant gastro-intestinal excretion virus. In order to do so, clinical signs, complete blood count, biochemistry, serum protein profile, FeLV provirus load, FCoV and feline panleukopenia virus (FPV) excretion were evaluated. reFeIFN- ω was administered to 16 cats (7 FIV, 6 FeLV and 3 co-infected) living at a Lisbon cat shelter; the licensed protocol was respected – 3 cycles of 5 injections, 1 UM/Kg, SID, SC – blood and faeces samples were collected at 0, 10, 30 and 65 days. Clinical signs improved in 10/16 cats, maintained in 5/16 cats and worsened in 1/16 cats. In FeLV infected cats, FeLV proviral load decreased in 2/6 cats, increased in 1/6 cats and remain stable in the other 3 cats; 1/3 co-infected cats decreased its FeLV proviral load, while the other 2/3 remain stable. FPV was detected in one cat at day 0. At day 65 all animals were negative for this virus. FCoV load decreased in 7/16 cats. The proteinogram profile revealed an important role on the immune system modulation. The biochemistry blood analysis showed no hepatic neither kidney toxicity. reFeIFN- ω therapy seemed to contribute to the decreasing of FIV and FeLV clinical signs and in the concomitant virus control.

Key words: feline recombinant omega interferon (reFeIFN- ω); feline immunodeficiency virus; feline leukaemia virus; clinical signs.

LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

O presente trabalho integra parte de um artigo publicado em revista internacional:

- **Gil, S.**, Leal, R., Duarte, R., McGahie, D., Sepúlveda, N., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Tavares, L. (2012). "Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retroviral-infected cats from a rescue shelter". *Research in Veterinary Science*, doi: 10.1016/j.rvsc.2012.09.025.

Foi ainda alvo de apresentação em dois congressos internacionais:

Gil, S., Leal, R., Duarte, A., McGahie, D., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Niza, M., Tavares, L. "Interferon- ω therapy on Feline Immunodeficiency and Leukemia infected stray cats: clinical improvement and control of concomitant viral excretion". SEVC - Southern European Veterinary - Congreso Nacional AVEPA, 29 Septiembre - 2 Octubre, 2011. Barcelona.

- **Gil, S.**, Leal, R., Duarte, A., Sepúlveda, N., McGahie, D., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Niza, M., Tavares, L. "Complete blood count (CBC), biochemistry and serum protein profile evaluation in Feline Immunodeficiency virus (FIV), Feline Leukemia virus (FeLV) and co-infected FeLV/FIV cats submitted to feline IFN ω (Fe-IFN ω) therapy". 21st ECVIM-CA congress, Sevilla, from the 8th till the 10th September 2011.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	vi
ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Trabalho Laboratorial.....	1
2. Objectivos.....	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Taxonomia.....	4
2. Replicação dos retrovírus.....	4
3. Organização genómica.....	5
4. Patogenia da infecção.....	8
5. Epidemiologia.....	10
6. Diagnóstico.....	11
6.1. Diagnóstico clínico.....	11
6.2. Diagnóstico laboratorial.....	12
7. Terapêutica.....	12
7.1. Interferão.....	13
8. Vírus concomitantes.....	15
8.1. Vírus da Panleucopénia Felina.....	15
8.2. Coronavírus Felino.....	16
MATERIAS E MÉTODOS	19
1. Desenho experimental.....	19
2. População alvo e amostragem.....	19
3. Protocolo terapêutico.....	20
4. Colheita e processamento de amostras.....	20
5. Avaliação clínica.....	21
6. Diagnóstico de FIV.....	21
7. Diagnóstico de FeLV.....	21
8. Extracção de ácidos nucleicos.....	22
8.1. Extracção de DNA.....	22

8.2. Extracção simultânea de DNA e RNA viral.....	22
9. PCR e QRT-PCR.....	22
10. Análises hematológicas, proteinograma e parâmetros bioquímicos.....	24
11. Análise estatística.....	25
RESULTADOS.....	26
1. Exame clínico.....	26
2. Resultados laboratoriais.....	29
2.1. Análises hematológicas.....	29
2.2. Parâmetros bioquímicos.....	35
2.3. Proteinograma.....	35
2.4. Carga de Provírus de FeLV.....	43
2.5. Avaliação da excreção de vírus concomitantes do tracto digestivo.....	44
2.5.1. Vírus da Panleucopénia Felina.....	44
2.5.2. Coronavírus Felino	44
DISCUSSÃO.....	46
1. Sinais clínicos.....	46
2. Hematologia.....	47
3. Análises bioquímicas.....	48
4. Proteinograma.....	48
5. Provírus de FeLV.....	49
6. Vírus concomitantes do tracto digestivo.....	50
CONCLUSÕES FINAIS.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1 - Resumo do trabalho de campo efectuado durante o estágio, integrado no Projecto Virose Felinas, durante o período entre dia 1 de Outubro de 2010 e 1 de Março de 2011.....	2
Tabela 2 - Caracterização e número das análises efectuadas no laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV no período entre 1 de Outubro de 2010 e 1 de Março de 2011.....	2
Tabela 3 – Parâmetros de avaliação do quadro clínico de cada gato e respectiva pontuação.....	23
Tabela 4 - Primers, posição e tamanho dos fragmentos usados no PCR (FPV) e no QRT-PCR (FCoV e FeLV).....	24
Tabela 5 - Temperaturas, tempo e número de ciclos do PCR e QRT-PCR.....	24
Tabela 6 – Estatística descritiva quanto à avaliação clínica dos grupos FIV, FeLV e Co-Infectados obtida nos dias de observações: Dia 0, Dia 10, Dia 30 e Dia 65.....	28
Tabela 7 – Classificação clínica absoluta (VA) e em percentagem (%) nos grupos FIV, FeLV e Co-Infectados. A evolução (Evo.) entre o Dia 0 e o Dia 65 é assinalada pelo sinal (+) para uma evolução positiva, (0) para uma evolução nula e (-) para uma evolução negativa.....	29
Tabela 8 – Máximo, mínimo, média e variação desta no Dia 0 e Dia 65 dos vários parâmetros do hemograma nos grupos FIV, FeLV e Co-Infectados.....	36
Tabela 9 – Resultados do Proteinograma no Dia 0 e Dia 65 dos gatos do grupo FIV, média e variação da média entre o Dia 0 e o Dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referência (g/dL).....	37
Tabela 10 - Resultados do Proteinograma no Dia 0 e Dia 65 dos gatos do grupo FeLV, média e variação da média entre o Dia 0 e o Dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referência (g/dL).....	39
Tabela 11 - Resultados do Proteinograma no Dia 0 e Dia 65 dos gatos do grupo FeLV, média e variação da média entre o Dia 0 e o Dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referência (g/dL).....	42
Tabela 12 – Comparação ao longo do tratamento das cargas virais de provírus de FeLV no grupo FeLV.....	44
Tabela 13 – Comparação ao longo do tratamento das cargas virais de provírus de FeLV no grupo Co-Infectados.....	44
Tabela 14 - Resultados do QRT-PCR para coronavírus, no grupo FIV.....	45
Tabela 15 - Resultados do QRT-PCR para coronavírus, no grupo FeLV.....	45
Tabela 16 - Resultados do QRT-PCR para coronavírus, no grupo Co-Infectados.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 - Esquema explicativo sobre a estratégia de replicação dos retrovírus. a) ligação a um receptor celular específico; b) penetração na célula; c) transcrição reversa; d) integração no genoma celular; e) provírus; f) transcrição; g) agregação da cápside; h) translação; i) <i>budding</i> ; j) maturação viral.....	6
Figura 2 - Estrutura e genoma do FeLV (a) e FIV (b). 1 – transcriptase reversa, 2 – proteínas de superfície, 3 – integrase, 4 – matriz, 5 – cápside, 6 – nucleocápside.....	7
Figura 3 - Estrutura e genoma do Parvovírus. a) estrutura do FPV; b) genoma do FPV.....	16
Figura 4 - Estrutura e genoma do Coronavírus. a) estrutura do FCoV; b) genoma da FCoV S) proteína <i>spike</i> , E) proteínas do envelope, M) proteínas da membrana, N) proteínas da nucleocápside, RNA) RNA genômico.....	17
Figura 5 - Teste ELISA para anti-corpos de FIV (à esquerda), o primeiro poço corresponde ao controlo positivo e o segundo poço o controlo negativo, os restantes são as amostras correspondentes aos gatos em estudos. PCR de Parvovírus (à direita), a) marcador de peso molecular; b) resultado positivo; c) controlos negativos; d) controlo positivo.....	26

ÍNDICE DE GRÁFICOS:

Gráfico 1 - Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com rFeIFN- ω do grupo FIV.....	27
Gráfico 2 - Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com rFeIFN- ω do grupo FeLV.....	27
Gráfico 3 - Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com rFeIFN- ω do grupo co-infectados.....	28
Gráfico 4 – Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 – 10,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$	29
Gráfico 5 - Variação do hematócrito individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 – 45,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$	30
Gráfico 6 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 – 19,5 $\times 10^3/\mu\text{L}$	30
Gráfico 7 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 – 7000/ μL	31
Gráfico 8 - Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 – 10,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$	31
Gráfico 9 - Variação do hematócrito individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 – 45,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$	32
Gráfico 10 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 – 19,5 $\times 10^3/\mu\text{L}$	32

Gráfico 11 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 – 7000/ μ L.....	33
Gráfico 12 – Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 – 10,0 $\times 10^3$ / μ L.....	33
Gráfico 13 - Variação do hematócrito individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 – 45,0 $\times 10^3$ / μ L.....	34
Gráfico 14 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 – 19,5 $\times 10^3$ / μ L.....	34
Gráfico 15 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 – 7000/ μ L.....	35
Gráfico 16 - Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 – 10,0 $\times 10^3$ / μ L.....	38
Gráfico 17 - Variação do hematócrito individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 – 45,0 $\times 10^3$ / μ L.....	38
Gráfico 18 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 – 19,5 $\times 10^3$ / μ L.....	39
Gráfico 19 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 – 7000/ μ L.....	40
Gráfico 20 - Média da concentração de Globulina- γ no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.....	40
Gráfico 21 - Média da concentração de Proteínas Totais no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.....	41
Gráfico 22 - Média da relação Albumina/Globulinas no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCD – The European Advisory Board on Cat Disease
Ac – anticorpo
Ag – antígeno
ALT - alanine aminotransferase
AMD3100 octahidrocloreto/JM3100/SID791 – 1,1'-[1,4-phenylenebis (methylene) bis-1,4,8,11 tetraazacyclotetradecane
ANOVA - analysis of variance
ARC - acquired immunodeficiency syndrome related complex
AST - Aspartate transaminase
AV – avaliação clínica
AZT – 3'-azido-2',3'-dideoximidina
BID – administração bi-diária
bp – par de bases
CBC – complete blood count (hemograma completo)
CCV – coronavírus canino
CSF – fluido cefaloraquidiano
ct – ciclo térmico
CTL – linfócito T citotóxico
DNA – ácido desoxirribonucleico
dsDNA – ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
dsRNA – ácido ribonucleico de dupla cadeia
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
enFeLV – vírus da leucemia felina endógeno
EUA – Estados Unidos da América
FAIDS – full-blown acquired immunodeficiency syndrome
FeCoV – coronavírus felino
FeLV – Vírus da leucemia felina
FeSV – vírus do sarcoma felino
FIV – Vírus da imunodeficiência felina
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
FOCMS – feline oncornavírus related cell membrane antigen
FPV – Parvovírus felino
Gp – glicoproteínas
HCV 229E – coronavírus serótipo 229E da bronquite humana
HIV – vírus da imunodeficiência humana
IFI – imunofluorescência reversa
IFN – interferão
IL - interleucina
ISG – genes interferon-stimulated
KDa – kilo Daltons
Kg – kilograma
LGL – large granular lymphocytes
LIFE – Faculty of Life Sciences
LTR – long term repeat
MDA – anti-corpos de origem materna
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mM – milimole
mL - mililitro
MLV – vírus vivo modificado
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
MU – partes por milhão
Ng – nanograma
ORF – open reading frames
PBS - phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PCR – polymerase chain reaction

PIF – peritonite infecciosa felina
P – proteína transmembranar
PO – *per os*
PT/TP – proteínas totais
PVF - parvovírus
QRT-PCR – real time polymerase chain reaction
reFeIFN- ω – interferão-ómega recombinante felino
reHuIFN- α – interferão-alfa recombinante humano
RNA – ácido ribonucleico
RT – transcriptase reversa
RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction
SC – subcutâneo
SI – sistema imunitário
SID – administração uma vez por dia
SNC – sistema nervoso central
SPF - Specific Pathogen Free
TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA
TEM – negative staining transmission electron microscopy
tRNA – ácido ribonucleic transportador
TGEV – vírus da gastroenterite transmissível suína
UTL – Universidade Técnica de Lisboa
UTR – untranslated region
VNA – anticorpos neutralizantes
 μ g – micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

ω - ómega
® - marca registada
 β - beta
 α - alfa
 γ - gamma
°C - graus Celsius
% - percentagem

INTRODUÇÃO

O presente estudo fez parte do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL).

O estágio consistiu num período de 5 meses, entre dia 1 de Outubro de 2010 e 28 de Fevereiro de 2011 no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV (Professor Doutor Luís Tavares), sob a Orientação da Doutora Solange Judite Alves Gil e a Co-Orientação da Professora Doutora Ana Isabel Pereira Duarte.

Durante este período, participei no Projecto Viroses Felinas do qual foi parte integrante o estudo apresentado nesta tese de dissertação. O estudo foi conduzido por uma equipa de investigação constituída pela Doutora Solange Judite Alves Gil, Prof. Doutora Ana Duarte, pelo Dr. Rodolfo Leal, Dra. Clara Cartaxeiro, Joana Cravo, Prof. Doutora Manuela Rodeia e Prof. Doutor Luís Tavares.

Um segundo estágio, na Universidade de Copenhaga, ocorreu durante o dia 1 de Março e 31 de Maio de 2011. O estágio ocorreu na área de epidemiologia, no grupo de pesquisa de biologia das populações, pertencente ao Departamento de Ciências de Grandes Animais da Faculty of Life Sciences (LIFE) da Universidade de Copenhaga. O tema do estágio foi: “*Streptococcus agalactiae* spread between dairy herds in Denmark – importance of Automatic Milk System and type Production”. A supervisão deste estágio esteve a cargo do Dr. Marshal Mweu e do Professor Doutor Søren Saxmose Nielsen.

1.Trabalho Laboratorial:

O presente trabalho de dissertação pretendeu avaliar o efeito terapêutico do reFeIFN- ω em gatos naturalmente infectados com os vírus FIV, FeLV e/ou co-infectados. De forma a avaliar esta terapêutica foram recolhidas amostras sanguíneas (determinação de hemogramas, análises bioquímicas para função hepática e renal e proteinogramas) e zaragatoas rectais e oro-nasais (pesquisa de vírus concomitantes) junto dos gatos seleccionados para integrar o estudo. A nível laboratorial o trabalho consistiu no isolamento de DNA e RNA viral para, posteriormente, se efectuarem os PCR e QRT-PCR para identificação e/ou quantificação dos vírus e suas cargas virais. Todos os gatos foram testados no Dia0 e Dia65 para FIV e FeLV pelo método ELISA.

Tabela 1 - Resumo do trabalho de campo efectuado durante o estágio, integrado no Projecto Virose Felinas, durante o período entre dia 1 de Outubro de 2010 e 1 de Março de 2011

<i>Dias</i>	<i>Tarefa</i>	<i>Nº de gatos</i>
D0	Recolha de sangue e zaragatoas rectal e oro-nasal	18
D0 a D5	Tratamento com Fe-IFNomega 1MU/Kg SC SID	16
D10	Recolha de sangue e zaragatoas rectal e oro-nasal	16
D14 a D19	Tratamento com Fe-IFNomega 1MU/Kg SC SID	16
D30	Recolha de sangue e zaragatoas rectal e oro-nasal	16
D60 a D65	Tratamento com Fe-IFNomega 1MU/Kg SC SID	16
D65	Recolha de sangue e zaragatoas rectal e oro-nasal	16

Tabela 2 - Caracterização e número das análises efectuadas no laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV no período entre 1 de Outubro de 2010 e 1 de Março de 2011.

<i>Agente</i>	<i>Material</i>	<i>Tipo de teste</i>	<i>Amostras</i>	<i>Positivos</i>
FIV	Sangue total, plasma ou soro	ELISA (Anti-corpos)	25	14
FeLV	Sangue total, plasma ou soro	ELISA (Antigénio)	24	11
FIV	Zaragatoa rectal	QRT-PCR	28	28
FeLV	Zaragatoa rectal	QRT-PCR	24	24
Coronavírus felino	Zaragatoa rectal	QRT-PCR	64	54
Parvovírus felino	Zaragatoa rectal	PCR	64	1

2. Objectivo:

Os Médicos Veterinário em Portugal, na sua prática clínica, deparam-se frequentemente com gatos infectados com FIV, FeLV ou co-infectados.

A terapêutica usual nestes casos é baseada nos indutores de Interferão ou no reHuIFN- α . O uso de reHuIFN- α está descrito na literatura (Pedretti et al., 2006) como sendo eficiente na manutenção dos estádios assintomáticos do FIV e FeLV. No entanto, como é um Interferão específico para humanos induz anticorpos após 3 a 7 semanas de terapia (Zeidner et al., 1990), o que impede o seu uso em terapêuticas contínuas.

Por seu lado, o reFeIFN- ω , há pouco tempo no mercado, parece ser um forte candidato para colmatar este problema do reHuIFN- α . Na altura em que este projecto foi iniciado, apenas um estudo tinha, então, sido publicado sobre os efeitos deste medicamento em gatos infectados com FIV e FeLV (de Mari et al., 2004). Assim, estudos comparativos entre os efeitos do reFeIFN- ω e reHuIFN- α em gatos infectados com os vírus acima referidos são necessários, nomeadamente o efeito destas medicações na quantificação viral, na modulação da resposta imunitária e nas possíveis alterações do quadro clínico.

Assim, o núcleo de Retrovirologia e Imunologia do Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (CIISA/FMV) com a colaboração do Hospital Escolar da FMV, da Virbac e da União Zoófila tem levado avante um trabalho de investigação sobre o reFeIFN- ω em gatos infectados com FIV e/ou FeLV.

O objectivo do meu trabalho dentro deste projecto de investigação foi avaliar em gatos infectados naturalmente com o vírus da leucemia felina (FeLV) e no decurso do tratamento com reFeIFN- ω , os seguintes pontos:

- 1) a evolução clínica no decurso do tratamento com reFeIFN- ω monitorizando as variações de parâmetros hematológicos (hemograma), hepáticos (ALT, AST), renais (ureia e creatinina) e proteinograma durante o tratamento.
- 2) quantificação de provírus FeLV
- 3) avaliar a existência e a excreção de vírus concomitantes, nomeadamente parvovírus felino (FPV) e coronavírus felino (FCoV);

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Taxonomia:

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) pertencem à sub-família *Orthoretroviridae*, família *Retroviridae*. O FIV é um vírus do género *Lentivirus*, enquanto o FeLV pertence ao género *Gammaretrovirus*.

O FIV foi, pela primeira vez, descrito em 1987 por Pedersen e colaboradores (Pedersen et al., 1987). A sua descoberta foi mais tardia, já que os fenómenos clínicos provocados por este vírus são mais discretos e espaçados no tempo, fazendo com que não se relacione facilmente as manifestações clínicas com uma entidade etiológica comum.

O FeLV foi descrito pela primeira vez em 1964 por W.F. Jarret, quando este observou partículas virais em linfoblastos neoplásicos de animais naturalmente infectados (Jarret, Crawford, Martin & Davie, 1964).

Morfologicamente os retrovírus possuem invólucro, cápside e no seu interior encontra-se o material genómico que é constituído por RNA. Todos os retrovírus possuem três genes: gene *pol*, que codifica a RT, protease e a integrase; gene *gag*, que codifica as proteínas da cápside, da matriz e da nucleocapside e o gene *env* que codifica as proteínas do invólucro viral. A capsíde é constituída por glicoproteínas e por proteínas transmembranares, gp70 e p150, respectivamente, no caso do FIV e gp95 e p41 no caso do FeLV. O invólucro é constituído pela membrana celular quando o vírus efectua o *budding* (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

O FIV afecta sobretudo, membros da família *Felidae* (Hayward & Rodrigo, 2010). Noutras espécies, como é o caso do leão africano (*Panthero leo*) e no puma norte-americano (*Puma concolor*), o FIV é, aparentemente, menos patogénico que no gato doméstico (Carpenter & O'Brien, 1995; Carpenter et al., 1996; Bull, Kennedy-Stoskopf, Levine, Loomis, Gebhard & Tompkins, 2003; Brennan et al., 2006; Roelke et al., 2006), sugerindo um mecanismo de adaptação vírus hospedeiro com uma diminuição da patogenicidade viral, espelhado na maior diversidade genética destes virus e por uma elevada prevalência na população (Brown, Yuhki, Packer & O'Brien, 1994; Carpenter et al., 1995; Biek et al., 2003). O FeLV é um vírus que afecta os gatos em todo o globo e alguns felídeos silvestres, como o gato selvagem *Felis silvestris* e os lince Europeu e Ibérico, *Felis lynx* e *Lynx pardinus*, respectivamente (Lutz et al., 2009).

2. Replicação dos retrovírus:

A replicação geral dos retrovírus inicia-se com a ligação do virião, através das suas espículas glicoproteicas, aos receptores membranares da célula hospedeira. Esta ligação é altamente específica, quer entre espécies, quer entre os vários tipos de células presentes no mesmo indivíduo. A entrada do FIV é mediada pelo receptor primário CD134, expresso nos

linfócitos CD4+, linfócitos B e macrófagos activados e pelo co-receptor CXCR4. Os receptores usados pelo FeLV dependem do subgrupo deste – existem 4 subgrupos de FeLV: A, B, C e T. O subgrupo A é o único contagioso e o principal responsável pela transmissão horizontal (Hartmann, 2006). O subgrupo B ocorre quando há recombinação entre o subgrupo A e o FeLV endógeno (enFeLV) (Lutz et al., 2009). O subtipo C é o resultado de mutações no gene *env* (Lutz et al., 2009). O subgrupo T, por sua vez, resulta de múltiplas mutações do gene *env* e é caracterizado pelo seu tropismo para os linfócitos T, é altamente citopático (Hartmann, 2006). O FeLV-A usa um transportador proteico de timina, o FeLV-B usa transportadores de fosfato inorgânico sódio-dependentes e o FeLV-T usa co-receptores FeLIX presentes nos linfócitos T, daí a sua alta especificidade para estas células (Dunham & Graham, 2008). Após esta ligação, o vírus entra na célula através da fusão entre a membrana plasmática e o invólucro viral. Enquanto este passo ocorre e até a cápside libertar o seu conteúdo, é formada, dentro desta, uma cadeia dupla de DNA através de uma enzima especializada, a transcriptase reversa (RT), a partir do RNA viral. Após a libertação do DNA da cápside viral, este dirige-se para o núcleo onde, por acção da integrase viral se integra no DNA celular, enquanto provírus (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

Quando da divisão celular, ocorre replicação do genoma viral.

Após activação, a transcrição do genoma viral leva à produção de RNA genómico e mRNA. Este mRNA irá ser traduzido em proteínas e o RNA genómico fará parte dos novos viriões. Estes novos viriões começam a ser formados junto à membrana plasmática, onde se reúnem o RNA genómico, e as proteínas enzimáticas e estruturais para formação da capsíde viral na face interna da membrana celular. Durante o processo de gemulação os viriões formam invólucro viral, com participação da membrana celular. A maturação do virião vital na infecciosidade viral ocorre exteriormente após saída da célula (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

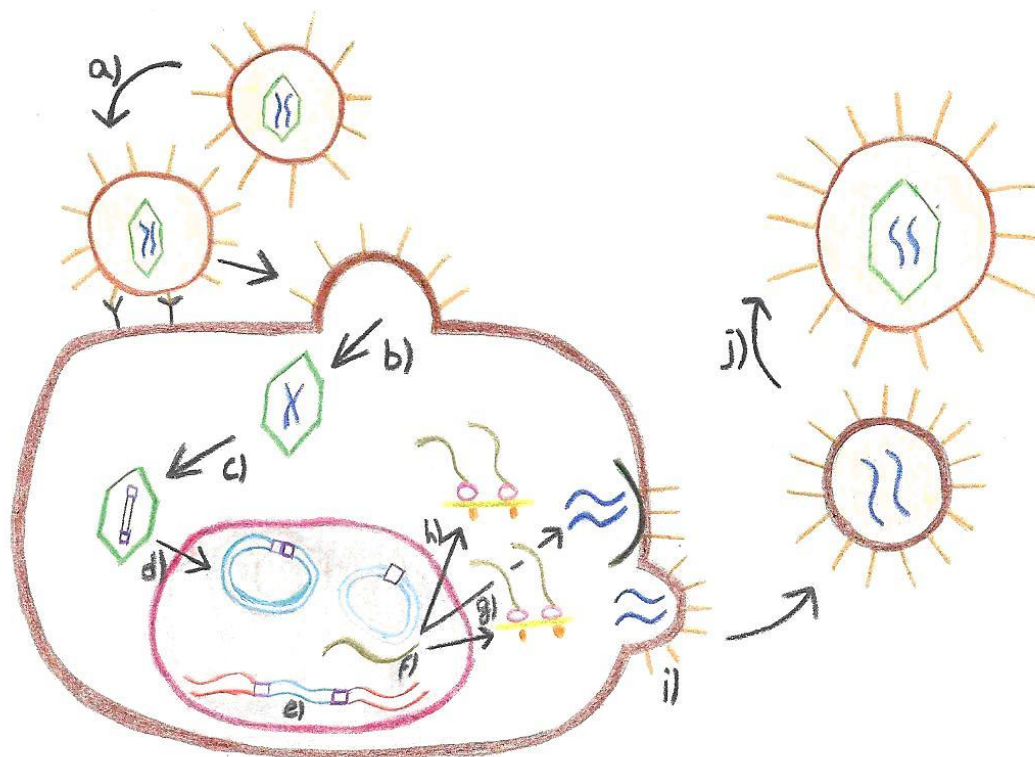
Enquanto o FeLV só se replica quando da divisão celular, o FIV, dado que codifica os genes reguladores *tat* e *rev*, consegue manter um padrão de transcrição autónomo. Quando esta expressão atinge um certo limiar, os restantes genes são activados dando início à produção de novos viriões (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

3. Organização genómica:

O FIV tem um diâmetro entre 100 nm e 125 nm. Tem um genoma diploide constituído por duas cópias de RNA genómico de cadeia simples e sentido positivo (Miyazawa, Tomonaga, Kawaguchi & Mikami, 1994). Por sua vez, os viriões de FeLV têm um diâmetro de cerca de 127 nm (DeBlois & Wesley, 1977); o seu genoma é constituído por uma única cadeia de RNA de sentido positivo (Gomes-Keller, Gönczi, Grenacher, Tandon, Hofman-Lehmann & Lutz, 2009).

Tanto no FIV como no FeLV, o RNA viral é transcrito em dsDNA (Soe, Devi, Mullins & Roy-Burman, 1983) pela transcriptase reversa e posteriormente integrado no genoma da célula hospedeira por intermédio da enzima viral integrase, enquanto provírus.

Figura 1 - Esquema explicativo sobre a estratégia de replicação dos retrovírus. a) ligação a um receptor celular específico; b) penetração na célula; c) transcrição reversa; d) integração no genoma celular; e) provírus; f) transcrição; g) agregação da cápside; h) tradução; i) *budding*; j) maturação viral.



Adaptado de Murphy por Inês Siborro, 2012.

Ambos os vírus possuem invólucro que deriva da membrana plasmática da célula hospedeira (Gomes-Keller, Gönczi, Grenacher, Tandon, Hofman-Lehmann & Lutz, 2009) e que inclui espículas glicoproteicas virais extremamente importantes na infecção das células hospedeiras, constituindo igualmente os primeiros alvos de actuação dos anticorpos (Bendinelli et al., 1995).

A organização genómica básica inclui

1 - gene *gag*, de *group specific antigen*, codifica as proteínas da cápside (p24 no FIV, p27 no FeLV), da matriz (p15 no FIV, p15 no FeLV) e da nucleocápside (p10 em ambos os vírus) que constituem a nucleocapside viral. A detecção de anticorpos anti p24 do FIV e da p27 no FeLV são importantes no diagnóstico.

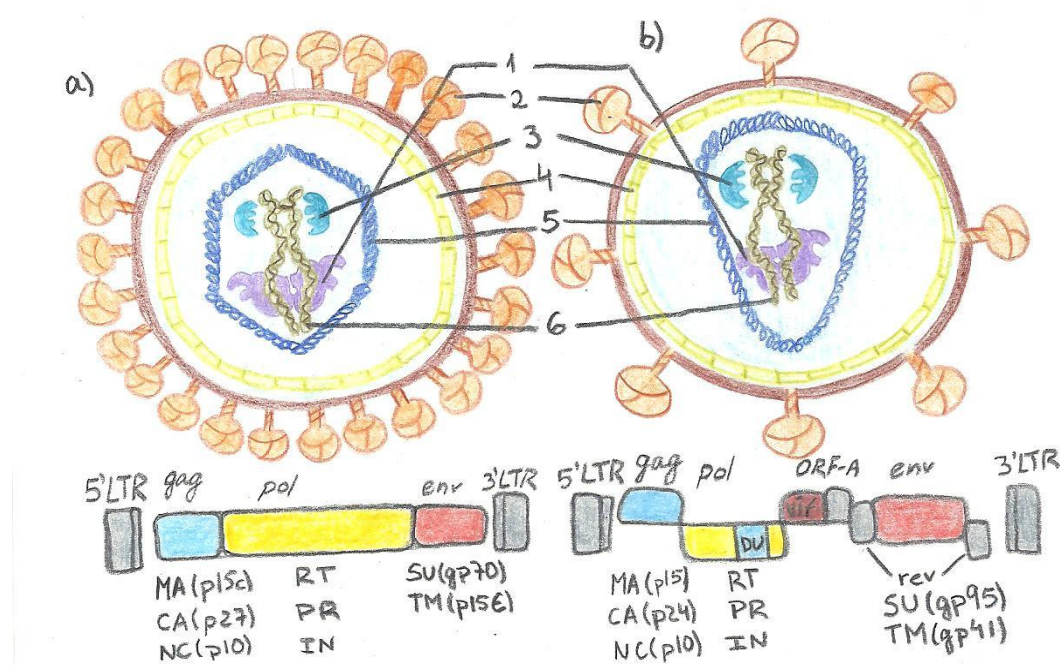
2 - gene *pol*, de polimerase, codifica a RT, que é a responsável pela transcrição do dsDNA a partir do RNA genómico. Codifica também a protease – que participa na maturação viral - e a integrase – importante na integração do provírus no genoma celular (Murphy). No FIV

codifica uma proteína adicional dUTPase (DU), presente nos Lentivírus de não-primatas que diminui a incorporação de uracil no DNA viral

3 - gene *env*, que codifica as proteínas do envólucro viral,. Com base na sua diversidade genética foram definidos 5 subtipos de FIV, A, B, C, D e E (Sodora, Shaper, Kitchell, Dow, Hoover & Mullins, 1994; Kakinuma, Motokawa, Hohdatsu, Yamamoto, Koyama & Hashimoto, 1995). A variabilidade genética do gene *env* no FeLV define 4 subgrupos: A, B, C e T, com diferentes propriedades biológicas.

Estes genes são ladeados de ambos os lados pelas *long terminal repeats* (LTRs) que possuem funções regulatórias da expressão e replicação viral (Hartmann, 2006).

Figura 2 - Estrutura e genoma do FeLV (a) e FIV (b). 1 – transcriptase reversa, 2 – proteínas de superfície, 3 – integrase, 4 – matriz, 5 – cápside, 6 - nucleocápside.



Adaptado de Rosado, 2009 por Inês Siborro, 2012

O FIV, para além dos 3 genes principais, ainda possui mais 3 genes reguladores característicos dos *Lentivírus*:

- gene *tat* (ORFA), codifica uma proteína que participa nos primeiros passos da replicação viral importante no mecanismo de activação da expressão viral (Miller, Cains, Bridges & Sarver, 2000).
- gene *rev*, cujo producto participa no transporte para o citoplasma celular, dos mRNA virais (Miller, Cains, Bridges and Sarver, 2000).
- gene *vif*, codifica um factor viral de infecciosidade, actuando em alguns passos da morfogénese do virião (Miller, Cains, Bridges and Sarver, 2000).

O virião dos retrovírus, inclui para além do RNA genómico, várias moléculas de RT e de tRNA.

4. Patogenia da infecção:

No FIV, após a entrada do vírus, as células linfoides e mieloides são o primeiro alvo da infecção. O FIV replica-se rapidamente nas células dendríticas, macrófagos, linfócitos T CD4+, o que leva à libertação de novas partículas virais e, consequentemente, ao pico da virémia 8 a 12 semanas após a infecção. Durante este período podem surgir sintomas clínicos: linfadenopatia generalizada, febre moderada, depressão, anorexia e neutropenia. Estes sinais clínicos, normalmente são ultrapassados, no entanto, a linfadenopatia associada ao aumento do número e tamanho dos centros germinativos foliculares pode continuar durante algumas semanas ou mesmo meses. A replicação viral é controlada pelo sistema imune: detectam-se linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs) na primeira semana após a infecção; mais tarde, ao mesmo tempo que ocorre o pico da infecção, aparecem anticorpos neutralizantes (VNAs) (Dunham & Graham, 2008). Assim, associada a esta imunidade específica verifica-se uma diminuição da carga viral no plasma, marcando o início da fase assintomática, a qual pode durar anos e, em alguns casos, até ao final da vida. A fase final é variável. Durante a fase assintomática, apesar da carga viral se manter estável, começa a haver um declínio progressivo do número de linfócitos CD4+, associado ao aumento de CD8+, levando à inversão da razão CD4/CD8 (Hartmann, 2011), paralelamente observa-se uma diminuição da resposta dos linfócitos T a estímulos antigénicos. Nesta altura os gatos podem apresentar linfadenopatia generalizada, infecções crónicas a nível oral, tracto respiratório e tracto gastro-intestinal. Outros sinais associados ao FIV são: febre, anorexia, perda de peso, alterações comportamentais não específicas e alterações do hemograma. Com o progresso da doença outras células do sistema imunitário são afectadas: os neutrófilos, ficando comprometida a sua capacidade de emigração para locais onde há infecção e adesão de bactérias; as células *Natural Killer* (NK) têm a sua capacidade aumentada ou diminuída em gatos que estão na fase aguda ou assintomática da infecção (Hartmann, 2011). As citocinas, como o interferão (IFN)- γ , factor de necrose tumoral (TNF)- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 estão aumentadas, a razão entre as diferentes citocinas também se altera, há um aumento excessivo das imunoglobulinas- γ . Com o aumento das imunoglobulinas, aumentam também os complexos imunes em circulação, o que resulta em doenças provocadas pela deposição destes, como é o caso da nefrite e da uveíte (Hartmann, 2011). Nesta fase, pode haver o aparecimento de infecções bacterianas secundárias, por *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus canis*, *Yersinia pseudotuberculosis* (Bendinelli et al., 1995), que por si só podem causar a morte do animal. No entanto, ao

estabelecer-se uma síndrome de imunodeficiência adquirida verifica-se o aparecimento de infecções oportunistas causadas por vírus (calicivirus, herpesvírus, coronavírus e poxvírus felino), bactérias, fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Microsporum canis*) ou parasitas (*Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, *Demodex canis*, *Notoedres cati* e *Otodectes cynotis*), com agravamento do estado clínico do animal. No entanto, o declínio do sistema imune na fase final é multifactorial, sendo que factores como as doenças concomitantes, stress crónico e factores genéticos relacionados com a resistência e susceptibilidade são importantes (Dunham & Graham, 2008).

No FeLV replicação viral inicial ocorre na orofaringe, mais especificamente nos linfócitos e macrófagos tonsilares. Daqui, o vírus difunde-se pelo organismo por via linfática e sanguínea. Após o desenvolvimento da virémia, o FeLV infecta rapidamente os seus alvos: células linfóides, mielóides e epiteliais. Esta fase da infecção é extremamente importante. Se o sistema imune conseguir controlar o vírus, a virémia pode ser extinta. Aproximadamente 60% dos gatos expostos ao FeLV conseguem ultrapassar a virémia. Nos restantes 30%, o sistema imune não consegue fazer face ao vírus, não conseguindo eliminar a virémia, estabelecendo-se uma infecção persistente. Há diminuição de linfócitos CD4⁺ (Thelper), podendo haver inversão do rácio CD4⁺/CD8⁺ (Hartmann, 2011), mas mais comum é a diminuição de CD8⁺ conjuntamente com o CD4⁺ (Hartmann, 2011). Também há diminuição da resposta dos linfócitos T, diminuição da reacção das imunoglobulinas, diminuição da função dos neutrófilos e do complemento (Hartmann, 2011). Para além disto, pode haver diminuição das IL-2 e IL-4, o IFN- γ pode estar aumentado ou diminuído (Hartmann, 2011) e o TNF- α sofre um aumento. Os factores estimulantes dos linfócitos B também estão diminuídos, verificando-se uma desregulação generalizada do sistema imune. As patologias relacionadas com o FeLV incluem linfoma, leucemia, anemia, enterite, imunossupressão, abortos e infertilidade (Dunham & Graham, 2008). Para além da imunossupressão, ainda pode haver doença devida a fenómenos imuno-mediados relacionados com a resposta excessiva ou mal-mediada do sistema imune. A formação e deposição dos complexos imunes podem causar a glomeronefrite e poliartrites. Estes complexos são compostos sobretudo por IgG e IgM associadas a partículas virais ou a proteínas virais como a gp70, gp27 ou a p15E (Hartmann, 2011). A integração do provírus no genoma celular tem a capacidade de alterar a expressão dos genes vizinhos, o que pode levar à depressão da medula óssea e/ou à formação de neoplasias (Hartmann, 2011).

5. Epidemiologia:

No FIV, as mordeduras entre gatos, quer sejam nos conflitos entre gatos, defesa de território ou no acasalamento, são a principal via de transmissão. Experimentalmente foi possível infectar animais através da mucosa vaginal com sêmen e por via transplacentária em fêmeas gestantes, no entanto, é pouco provável que estas vias tenham grande importância na infecção natural.

A prevalência do FIV em gatos de companhia é cerca de 4%-12% a nível mundial (Courchamp & Pontier, 1994). Os países que possuem prevalências mais baixas são os EUA e o Canadá (Shelton, Waltier, Connor & Grant, 1989; Yamamoto et al., 1989; O'Connor, Tonelli & Scarlett, 1991). O Japão, por outro lado, é o país com prevalência mais alta, com cerca de 23% de gatos seropositivos V (Nakamura, Sato, Miura, Baba, Shimoda & Miyazawa, 2010). Gatos errantes têm uma prevalência superior, entre 8%-19% (Baneth, Kass, Steinfel & Besser, 1999; Winkler, Löchelt & Flower, 1999; Ostrowski, van Vuuren, Lenain & Durand, 2003; Danner, Goltz, Hess & Banko, 2007; Hayward, 2009) em relação aos gatos que são mantidos em casa. Esta diferença justifica-se por os gatos de rua terem vida livre, em geral, serem mais agressivos nas suas interações sociais, fazendo com que a frequência das mordedelas seja maior, quer nas lutas, quer no acasalamento (Courchamp, Yaccoz, Artois & Pontier, 1998), a principal via de contágio.

Os principais factores de risco, para além do acesso ao exterior, são: ser machos e inteiros (Hosie, Robertson & Jarret, 1989; Courchamp, Yaccoz, Artois & Pontier, 1998; Levy, Scott, Lachara & Crawford, 2006).

Os subtipos mais comuns a nível mundial são o A, B e C; o subtipo D só foi encontrado no Japão e Vietnam (Kakinuma, Motokawa, Hohdatsu, Yamamoto, Koyama & Hashimoto, 1995; Nakamura et al., 2003) e o subtipo E na Argentina (Pecorato et al., 1996). Recentemente, Weaver e colaboradores (2004) propuseram a atribuição dum sexto subtipo, denominado F, após a detecção de sequências virais divergentes das restantes (Hayward & Rodrigo, 2010). A infecção pelo subtipo A está frequentemente associada a sinais neurológicos (Nishimura et al., 1996; de Rozieres et al., 2008), enquanto o subtipo B induz uma infecção pouco expressiva (Bachmann et al., 1997) (Hayward & Rodrigo, 2010).

A principal via de transmissão do FeLV é a saliva, quer seja através de mordeduras ou do *grooming* entre gatos e através das fezes, embora muito menos comum, mas a considerar em gatos que partilhem a mesma liteira (Gomes-Keller, Gönczi, Grenacher, Tandon, Hofman-Lehmann & Lutz, 2009). O vírus, para além da saliva e das fezes, também se encontra em secreções nasais e no leite.

O FeLV é vírus que afecta todas as regiões do globo. No entanto, a sua prevalência varia grandemente de região para região. Em certos países da Europa, EUA e Canadá, a prevalência em gatos mantidos individualmente é muito baixa, normalmente inferior a 1%

(Hosie, Robertson & Jarrett, 1989; Levy, Scott, Lachtara & Crawford, 2006; Lutz et al., 1990). Em locais onde vivem muitos gatos sem medidas de prevenção em relação à introdução de animais infectados, a prevalência pode chegar aos 20% (Lutz et al., 2009), a taxa de mortalidade é de 50% em 2 anos e 80% em 3 anos (Cotter, 1998; Levy, 2000).

A sua prevalência está intimamente relacionada com a densidade populacional de gatos. Nos últimos anos, a prevalência na Europa tem diminuído drasticamente devido à detecção dos gatos infectados, programas de segregação entre animais infectados e não infectados e à introdução de vacinas contra o FeLV (abcdCats).

O FeLV está dividido em 4 subgrupos: A, B, C e T.

Os factores de risco são comuns para o FeLV e para o FIV, ou seja, gatos machos, adultos, não castrados e com acesso ao exterior. Por outro lado, viver apenas em casa e a esterilização são considerados factores protectores, já que estão associados à diminuição da prevalência (Levy, Scott, Lachtara & Crawford, 2006).

A idade também é um factor de risco importante, principalmente no FeLV. Animais jovens são especialmente susceptíveis à infecção, a resistência à infecção aumenta com a idade, sendo que os gatos adultos são mais resistentes. No entanto, a infecção pode ocorrer mesmo neste caso se o tempo e as cargas virais a que estão expostos for suficientemente longo e altas (Lutz et al., 2009).

6. Diagnóstico:

6.1. Diagnóstico clínico:

O diagnóstico clínico, não é fácil principalmente no FIV em que o mais comum são as infecções secundárias.

No entanto, certos sinais são particularmente relevantes para o diagnóstico etiológico das retroviroses.

Em ambas as viroses, infecções bacterianas, fúngicas, virais ou parasitárias por agentes pouco comuns ou que reincidam apesar do tratamento devem fazer o médico veterinário suspeitar que o gato possa estar infectado com uma retrovirose. Tumores, gengivoestomatite crónica, insuficiência renal, problemas reprodutivos, doenças do fórum neurológico, poliartrite, linfadenopatia generalizada e leucopénia com linfopénia e/ou neutropénia são outras doenças que devem alertar para a possível infecção por retrovírus dos indivíduos. (Hosie et al., 2009).

No FIV há diminuição de CD4+, inversão do ratio CD4+/CD8+ e hipergama-globulinémia. No FIV, na fase aguda de replicação viral, pode-se detectar neutropénia com leucocitose, isto deve-se ao aumento dos granulócitos (*large granular lymphocytes*) (LGLs), com o desenvolver da infecção e da imunossupressão, esta linfocitose reverte para linfopénia (Sprague, Terwee & VandeWoude, 2010).

No FeLV, é comum haver linfopénia, neutropénia, neutrófilos alterados, diminuição de linfócitos CD4+, podendo haver inversão do ratio CD4+/CD8+, no entanto, é mais comum haver diminuição de CD8+. O hemograma ainda pode revelar anemia, que pode ser de qualquer tipo. (Hosie et al., 2009).

Quanto às análises bioquímicas, tanto no FIV como no FeLV, destaca-se a possibilidade das análises do perfil renal – creatinina e ureia – estarem alteradas devido a glomerulonefrite provocada pela deposição de complexos imunes.

Se, por algum motivo, houver suspeita que um gato esteja infectado com FIV e/ou FeLV deve-se efectuar o diagnóstico serológico para determinação de anticorpos anti-FIV e antígeno p27 para o FeLV. (Hosie et al., 2009).

6.2. Diagnóstico laboratorial:

Para além do diagnóstico serológico, habitualmente efectuado por ELISA ou por imunocromatografia, pode ainda efectuar-se por *immunoblotting*, imunofluorescência indirecta (IFI), quantificação de RT, isolamento viral, microscopia electrónica, PCR convencional e QRT-PCR (Ammerbach & Bienzle, 2011).

A detecção de ácido nucleico viral, por PCR ou QRT-PCR é particularmente útil no FeLV porque nem sempre se detecta virémia, especialmente na infecção persistente. A técnica “*gold standard*” para a detecção de FIV e FeLV continua a ser o isolamento seguido de microscopia electrónica (Ammerbach & Bienzle, 2011), no entanto, é uma técnica demorada e dispendiosa.

7. Terapêutica:

A maioria dos anti-virais disponíveis estão licenciados para o uso em humanos e foram concebidos para o tratamento do HIV. Alguns podem ser usados nos gatos para a terapêutica do FIV e do FeLV, no entanto, muitas destes fármacos são tóxicos para os gatos, ou, por outro lado, não são eficientes em relação ao FIV e o FeLV (Hosie et al., 2009).

- AZT (3'-azido-2',3'-dideoximidina) - é um análogo da timidina, que bloqueia a transcrição reversa dos retrovírus. O AZT diminui a carga viral no plasma, aumenta a resposta imunitária, havendo melhorias a nível clínico. A dose é de 5-10mg/kg BID PO ou SC. A dose mais alta deve ser usada com muito cuidado, pois podem observar-se efeitos secundários; é desaconselhado a animais com supressão da medula óssea. No entanto, o AZT é bem tolerado a longo termo. A sua grande desvantagem é o facto de surgirem vírus resistentes a este fármaco, o que pode acontecer em apenas 6 meses de tratamento (Hosie et al., 2009).

- AMD3100 octahidrocloreto (1,1'- [1,4-phenylenebis(methylene)] bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane), JM3100, SID791 - pertence à classe dos biciclamos que são

antagonistas selectivos do receptor da quimiocinas CXCR4 (Hosie et al., 2009). A CXCR4 é o co-receptor do FIV e o seu bloqueio inibe a entrada do vírus na célula (Hosie et al., 2009). O AMD3100 não está licenciado como antiviral, mas sim como activador das células estaminais em pacientes que sofreram um transplante da medula óssea (Hosie et al., 2009). Os gatos melhoram significativamente a nível clínico e a carga proviral diminui (Hosie et al., 2009). A dose é de 0.5 mg/kg BID SC durante 6 semanas (Hosie et al., 2009). Não há efeitos secundários visíveis (Hartmann, Stengel, Klein, Egberink & Balzarini, 2002).

7.1. Interferão:

Os interferões são os membros mais estudados das citocinas, que são proteínas reguladoras importantes no sistema imunitário dos mamíferos (Sen, 2001). É produzido nas células (fibroblastos, linfócitos e células hematopoiéticas) de mamíferos quando estas são alvo de uma infecção viral, sendo veiculado pela circulação e actua nas células não infectadas, induzindo-as a um estado antiviral (Sen, 2001).

Para além da função anti-viral, os interferões são importantes em vários aspectos da fisiologia celular, actuando como agentes de estimulação da expressão génica celular (Sen, 2001).

Na relação vírus-hospedeiro, a regulação dos componentes do sistema dos interferões é complexa e multifacetada. Os vírus infectam as células, resultando em produtos genéticos dos vírus, estes induzem a síntese e excreção de IFNs. Os IFNs, por sua vez, ligam-se aos domínios extracelulares dos receptores espécie-específicos existentes na superfície da célula, o que conduz à activação dos genes *IFN-stimulated* (ISG) cujos produtos inibem, em diversos estádios, a replicação viral. No entanto, algumas destas proteínas virais são latentes até à sua activação por produtos virais. Alguns ISGs podem ser activados directamente, por exemplo, pelo RNA viral, assim, as proteínas resultantes destes genes são formadas nas células infectadas por vírus sem que haja intervenção dos IFNs (Sen, 2001).

Por outro lado, há um equilíbrio dinâmico entre os IFN's e os vírus, já que muitas proteínas interferem com os IFNs e o RNA viral interfere com o funcionamento do sistema dos IFNs em todos os passos: a sua adesão às células, ao seu activamento pelo RNA viral, a activação dos ISGs e a funcionalidade das proteínas que são formadas pelo IFNs. De um ponto de vista evolutivo, este equilíbrio é importante, já que um vírus que induza uma forte resposta imunitária, induz uma forte resposta por parte do sistema dos IFNs, logo, vão propagar-se pouco; por outro lado, um vírus muito virulento que consiga sobrepor-se à resposta dos IFNs, vai matar o hospedeiro rapidamente (Sen, 2001).

Há dois grupos de IFNs, o grupo I, ao qual pertencem os interferões α , β , ω e τ (este último só existe em ungulados); e, o grupo II que é constituído apenas pelo IFN γ . Ambos os grupos têm actividade anti-viral, no entanto, actuam em receptores membranares distintos e estruturalmente são diferentes (Sen, 2001).

Os tipos de células que produzem os vários tipos de IFN I são diferentes: os IFN- β são produzidos por várias células não hematopoiéticas, sendo, também, conhecidos como *fibroblast* IFN; o IFN- α é produzido pelos leucócitos; e o IFN- ω é produzido pelas células hematopoiéticas (Sen, 2001).

Os interferões I são espécie-específicos, mas conseguem actuar, em certa medida, noutras espécies, já os interferões II são altamente espécie-específicos (Sen, 2001).

Existem no mercado dois interferões que são usados na terapêutica de retroviroses em gatos, o interferão- α recombinante humano (reHuIFN- ω) (Roferon®) e o interferão- ω recombinante felino (reFeIFN- ω) (Virbagen®). O reHuIFN- α é específico dos humanos e comercializado como tal. Embora com um preço mais acessível tem a desvantagem de não ser específico para gatos, havendo formação de anticorpos ao fim de algum tempo. No entanto, foi reportado, por vários autores, o seu benefício em relação às infecções virais, nomeadamente, por FIV e FeLV. Existem dois protocolos para o uso do reHuIFN- α em gatos, um de alta dose (10^5 - 10^6 U/kg), administração subcutânea (SC), uma vez por dia (SID), durante 7 dias, seguido de pausa de outros 7 dias, durante 6 meses. Este protocolo tende a baixar as cargas virais dos retrovírus, no entanto, o seu benefício para a saúde do animal é limitada, pois há a formação de anticorpos contra o reHuIFN- α (Zeidner, Myles, Mathiason-DuBard, Dreitz, Mullins & Hoover, 1990). Assim, foi criado um protocolo alternativo, de baixa dose: 1-50 U/kg, SID, via oral (PO), durante 7 dias seguidos, com pausa de 7 dias, durante 6 meses. Este protocolo, em alguns estudos, demonstrou diminuir a taxa de mortalidade e melhorias a nível clínico e analítico (Steed, 1987; Cummins, Tompkins, Olsen, Tompkins & Lewis, 1988; Weiss, Cummins & Richards, 1991; Pedretti et al., 2006), no entanto, McCaw e colaboradores (2001) não registaram nenhuma melhoria com este mesmo protocolo (Doménech et al., 2011). No entanto as melhorias observadas só ocorrem durante um período de tempo limitado, pelo que torna este IFN desvantajoso para a sua utilização em gatos em infecções crónicas como são as retroviroses por FIV e FeLV (Doménech et al., 2011).

O interferão omega recombinante felino (reFeIFN- ω) não induz a formação de anticorpos. O reFeIFN- ω tem uma homologia de 60% em relação ao HuIFN- α 1 e HuIFN- ω 1, sendo classificado como ω devido à sequência amino-acídica final no extremo amina da proteína (de Mari et al., 2004). O protocolo recomendado pelo laboratório que comercializa o reFeIFN- ω (Virbagen®, Virbac, França) é de 1MU/kg, SID, SC, três ciclos de tratamento,

cada um de 5 dias, o segundo e terceiro ciclo devem ser feitos 14 e 60 dias após o início do primeiro ciclo, respectivamente.

Collado e colaboradores (2012) demonstraram, *in vitro*, a efectividade de ambos os IFNs comercializados na inibição da replicação tanto do FIV como do FeLV, assim como a maior eficácia por parte do reFeIFN- ω .

De Mari e colaboradores (2004), verificaram melhorias dos sinais clínicos relacionados com FIV/FeLV, assim, como diminuição da taxa de mortalidade após utilização do protocolo licenciado A contagem de eritrócitos e o leucograma também melhoraram com o tratamento.

8. Vírus concomitantes:

A imunossupressão induzida pelo FIV e/ou FeLV pode levar a infecções oportunistas ou secundárias que de outro modo o sistema imunitário controlaria. Assim, a presença de vírus concomitantes pode ser importante no prognóstico e na qualidade de vida dos gatos FIV e/ou FeLV-positivos.

De seguida serão abordados os vírus patogénicos do tracto gastro-intestinal dos gatos, o Parvovírus Felino e o Coronavírus Felino (FeCoV).

8.1. Parvovírus Felino:

O Parvovírus é um vírus DNA, sem invólucro que infecta células em mitose (Prescott, Harley & Klein, 2005). É um dos vírus mais pequenos e simples que existem; pertence à família Parvoviridae, subfamília Parvovirinae e género Parvovirus. Afecta sobretudo animais jovens, embora qualquer gato em qualquer idade possa ficar infectado. Tem tropismo para células com alto índice mitótico. Em fetos de canídeos infecta células do miocárdio e do cerebelo; em felídeos jovens a sua patogenecidade verifica-se a nível da medula óssea, órgãos linfoides e epitélio intestinal (Truyen et al., 2009).

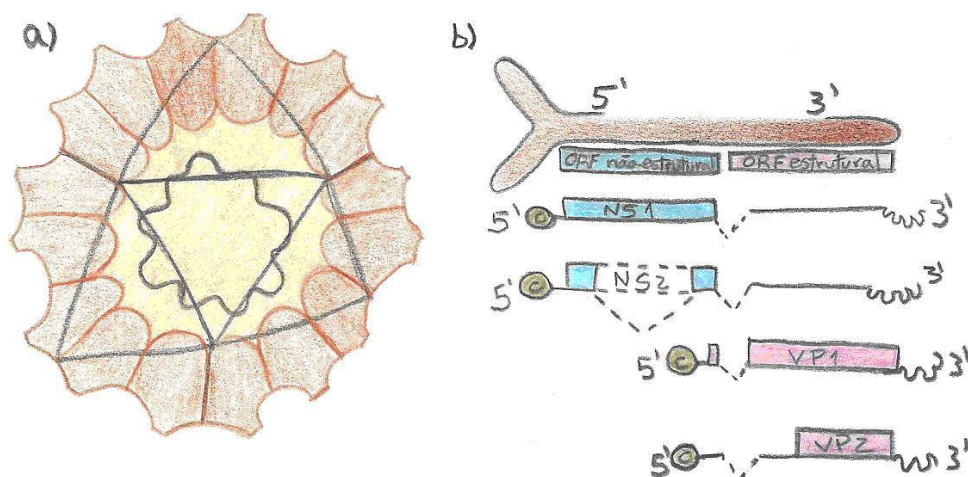
O parvovírus, por não possuir invólucro e por ter uma cápside com uma arquitetura proteica muito estável, é um vírus muito resistente no meio ambiente, resistindo a pH e a temperaturas extremas. Por este motivo, a higiene do espaço e a vacinação dos gatos é muito importante para evitar a doença. Animais muito jovens e que partilhem o mesmo espaço com outros animais são particularmente susceptíveis a este vírus.

Em cães o diagnóstico clínico efectua-se através da história pregressa, presença de diarreia com cheiro característico e vómito – a presença destes dois sinais clínicos está relacionada com a gravidade da infecção: animais que ainda não os tenham têm um prognóstico mais favorável. Nos gatos ocorre igualmente diarreia, sendo que neste caso, apesar de a desidratação não ser tão grave, há igualmente linfopenia, neutropenia, que pode evoluir para trombocitopenia e anemia, havendo uma panleucopenia generalizada, sendo este o sinal clínico mais grave. Nos gatos muito novos (até dois dias de vida) pode ocorrer ataxia

cerebelar, fazendo com que estes fiquem com descoordenação motora para o resto da vida. As gatas virémicas em gestação abortam, resultando em embriões fossilizados ou nados-mortos conforme a altura da gestação (Truyen et al., 2009).

Para confirmar o agente etiológico, a utilização de imunocromatografia permite a detecção de antígeno nas fezes (Addie, Toth, Thompson, Greenwood & Jarret, 1998).

Figura 3 - Estrutura e genoma do parvovírus. a) estrutura do FPV; b) genoma do FPV.



Adaptado de Rosado, 2009 por Inês Siborro, 2012.

8.2. Coronavírus Felino:

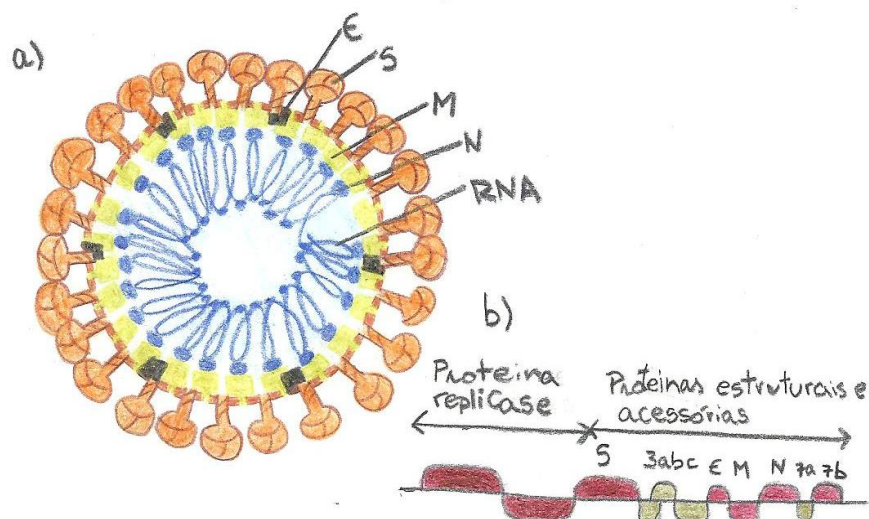
É um vírus RNA com invólucro pertencente à ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília Coronavirinae, género Alphacoronavirus, espécie *Alphacoronavirus 1*.

O coronavírus felino (FeCoV) é dividido em dois subtipos: subtipo I e subtipo II, com base na reactividade que cada serotipo tem para anticorpos monoclonais específicos para a proteína S (*spike*) presente à superfície destes vírus, assim como na análise da sequência genética do gene S (Addie & Jarret, 2006; Shiba, Maeda, Kato, Mochizuki & Iwata, 2007).

Devido à sua estratégia de replicação, o FeCoV está associado a uma elevada frequência de recombinação (Knife, Griffin, Lamb, Straus, Howley & Martin, 2007), levando à rápida formação de novas estirpes virais com tropismo e patogenicidade variada (Dye & Siddel, 2007). Para além disto, o facto da sua RNA polimerase não ter actividade correctora durante a replicação, permite a acumulação de mutações e erros dando origem a diferentes população virais heterogéneas intimamente relacionadas entre si definidas como *quasispecies* (Battilani et al., 2003). A maioria dos gatos infectados ou permanecem assintomáticos ou apenas desenvolvem uma enterite suave; só uma pequena proporção de gatos infectados desenvolve Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (Pedersen, Ho, Brown & Yamamoto, 1987), uma doença piogranulomatosa, progressiva, debilitante e mortal que

atinge membros domésticos e selvagens da família Felidae (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

Figura 4 - Estrutura e genoma do coronavírus. a) estrutura do FCoV; b) genoma do FCoV; E) proteína do envelope; S) proteína *spike*; M) proteína da membrana celular; N) proteína da nucleocápside; RNA) RNA genômico



Adaptado de Rosado, 2009 por Inês Siborro, 2012.

A infecção é especialmente comum em gatos que partilham a mesma casa/abrigo, podendo haver 90% a 100% de seropositividade (Kummrow et al., 2005).

A complexidade dos *quasispecies* está correlacionada com a gravidade dos sinais clínicos e das lesões dos órgãos (Battilani et al., 2003). A virulência das várias estirpes de FeCoV tem sido relacionada com a sua capacidade para infectar os macrófagos peritoneais. Para além de diferenças de patogenicidade viral, o desenvolvimento de uma resposta imunitária predominantemente celular parece conferir uma menor probabilidade de desenvolvimento de PIF, em relação a uma resposta imunitária humoral (Pedersen, Ho, Brown & Yamamoto, 1987).

A prevalência da PIF também depende da idade dos animais – 70% dos gatos que desenvolvem PIF têm idade inferior a um ano (Hartmann, 2005); do local onde habitam; da raça – os Persas parecem ser mais susceptíveis, assim como algumas linhagens dentro da mesma raça (Pestenu-Somogyi, Radzai & Pressler, 2006) e do género – gatos machos inteiros têm um risco mais elevado de adoecerem (Pestenu-Somogyi et al., 2006).

Para além destes factores de risco, destaca-se a presença da imunossupressão como causa para o desenvolvimento de PIF, induzida pelo stress crónico, ou por infecção por FIV e por FeLV (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

Este vírus provoca lesões piogranulomatosas e de vasculite. Os sinais clínicos iniciais são pouco específicos e variáveis como a anorexia, febre, letargia e perda de peso (Murphy,

Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999). Por vezes, pode haver manifestações neurológicas e oculares (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999).

Clinicamente estão identificadas duas formas, a forma efusiva ou húmida e a forma não-efusiva ou seca (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999), podendo encontrar-se gatos que apresentem formas intermédias (Addie et al., 2009). Todas as formas de PIF são mortais e a progressão da doença pode ser uma consequência da imunodepressão devido à depleção de linfócitos T (de Groot-Mijnes, van Dun, van der Most & de Groot, 2005).

O diagnóstico clínico é difícil, ficando muito facilitado em casos em que há derrame torácico e/ou abdominal, nestes casos deve-se extrair o derrame e enviar uma amostra para análise para verificar a presença do FeCoV. Se não houver derrame, é muito difícil ter um diagnóstico final, já que a presença de FeCoV não significa a presença de PIF. O proteinograma pode ser útil quando há sinais clínicos: a presença de hipeglobulinémia- γ e a hiperglobulinémia- α_2 (Taylor, Tappin, Dodkin, Papasouliotis, Casamian-Sorrosal & Tasker, 2010).

A nível laboratorial os exames que mais se efectuam é o RT-PCR para detecção de RNA viral e a ELISA para detecção de anticorpos. Outros exames possíveis são a imunofluorescência e a imunohistoquímica. Este último é o melhor método quando não existe derrame, no entanto, como exige biopsia, pode ser contraproducente em animais que já se encontram debilitados (abcdCats).

Não há tratamento específico para o PIF, apenas de suporte. No entanto, Ishida e colaboradores (2004), usando reFeIFN- ω associado a corticoterapia, conseguiram 33.3% de remissão total (sobrevivência superior a dois anos).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Desenho experimental:

O estudo consistiu no tratamento com reFeIFN- ω de 16 gatos e avaliação da sua eficácia. O tratamento e observação duraram 65 dias.

O tratamento consistiu em 3 ciclos de 5 dias de tratamento; os ciclos começaram nos dias 0, 14 e 60.

Ao dia 0, 10, 30 e 65, os animais foram submetidos a exame clínico e foram recolhidas amostras de sangue, zaragatoas rectais e oro-nasais.

No âmbito do trabalho apresentado foram processadas as amostras de sangue para análises hematológicas (parâmetros bioquímicos e proteinograma) e quantificação de provírus FeLV; as zaragatoas rectais foram usadas para a detecção de parvovírus felino e quantificação da excreção de coronavírus felino.

2. População alvo e amostragem:

A população alvo consistiu em gatos infectados naturalmente com FIV e/ou FeLV com sintomas associados a estas viroses, que não se encontrassem em estado terminal, alojados num abrigo para gatos em Lisboa pertencente à União Zoófila; os gatos estudados estavam divididos em dois gatis: um ocupado por gatos infectados com FIV, num total de 7 gatos e outro constituído por gatos infectados com FeLV e gatos co-infectados, num total de 9 gatos. Ambos os gatis eram constituídos por uma divisão de betão dividida em duas partes, uma mais abrigada apenas com janelas na parte superior da parede, a outra que tinha uma janela panorâmica que se encontrava sempre aberta para a entrada de luz.

Os critérios de inclusão foram (de Mari et al., 2004):

- Gatos de qualquer idade, raça e sexo;
- Gatos que apresentem pelo menos um sinal clínico potencialmente relacionado com FIV ou FeLV;
- Gatos com resultados positivos a testes ELISA (testes rápidos) para FIV/FeLV.

Os critérios de exclusão, por seu lado, foram (de Mari et al., 2004):

- Gatos com outra doença associada (linfoma, leucemia linfóide) ou em fase terminal;
- Gatos tratados com imuno-moduladores;
- Gatos aos quais não tenha sido efectuado o protocolo completo.

Os gatos seleccionados (n=16) foram divididos em três grupos:

- Grupo FIV, constituído por 7 gatos, 5 machos (Gato 1; 3; 4; 5; 10) e 2 fêmeas (Gato 8; 9).
- Grupo FeLV, constituído por 6 gatos, 4 machos (Gato 12; 13; 15; 18) e 2 fêmeas (Gato 11; 17).
- Grupo Co-Infectados, constituído por 3 gatos, 1 macho (Gato 16) e 2 fêmeas (Gato 21; 22).

Todos os animais eram gatos errantes, recolhidos pela União Zoófila, adultos, de raça Europeu Comum. A todos os gatos se efectuou o teste ELISA para detecção de anticorpos para FIV e teste ELISA para detecção de antígeno p27 para FeLV. Conforme o resultado (positivo só para FIV; positivo só para FeLV; ou positivo a ambos), foram formados três grupos: grupo FIV, grupo FeLV e grupo co-infectados, respectivamente.

3. Protocolo terapêutico:

O protocolo terapêutico licenciado consistiu em 3 ciclos de 5 administrações de 1MU/Kg de IFN omega recombinante felino (reFeIFN- ω), com o nome comercial Virbagen Omega® (Virbac, França) por via sub-cutânea (SC) de 24 em 24 horas. O primeiro ciclo começou no Dia 0, o segundo ocorreu duas semanas após o início do primeiro, no Dia 14, o terceiro ciclo começou no Dia 60, ou seja, 5 semanas após a última administração do segundo ciclo.

4. Colheita e Processamento das amostras:

Durante o exame clínico realizado durante a terapia foi recolhido material biológico aos dias 0, 10, 30 e 65. As amostras recolhidas consistiram em sangue em EDTA, sangue em heparina, soro e zaragatoas oronasais e rectais. Os gatos foram previamente tranquilizados com butorfenol. Para a recolha das amostras os gatos foram contidos por três pessoas – uma a agarrar nas patas dianteiras, outra nas patas traseiras e uma terceira pessoa a fazer pressão sobre o tronco e a endireitar a cabeça do gato com a ajuda de um colar isabelino de tamanho adequado. O gato era mantido, desta forma, em posição de esfinge. Usou-se a veia jugular para a recolha de sangue.

Após a colheita, o sangue foi dividido por vários tubos de ensaio vendidos especificamente para o armazenamento deste material biológico para a realização de análises que ajudaram a monitorizar a evolução clínica, nomeadamente hemogramas (sangue EDTA), análises bioquímicas (sangue heparina) – ureia, creatinina, ALT e AST -, proteinograma (soro) – proteínas totais (PT), albumina, globulinas alfa 1 (α 1), alfa 2 (α 2), beta (β) e gama (γ). No laboratório de Virologia centrifugaram-se amostras de sangue EDTA, durante 5 minutos a 2000xg, para a separação do plasma, utilizado para confirmação de positividade de infecção por ELISA e posteriormente armazenado a -80°C até extracção de RNA viral para quantificação da virémia por QRT-PCR. As células resultantes da centrifugação foram utilizadas para extracção de DNA para posterior quantificação de provírus. As zaragatoas rectais foram homogeneizadas em PBS e utilizadas para extracção de RNA e DNA viral para posterior quantificação de excreção de coronavírus e detecção de parvovírus.

5. Avaliação clínica:

Para tornar a avaliação clínica o mais objectiva e homogénea possível - quer entre gatos, quer nos diferentes dias em que os gatos foram avaliados, foi criada uma escala, na qual, conforme a gravidade dos sinais clínicos, a pontuação vai aumentando. Quanto pior for a avaliação clínica mais alta será a sua pontuação (Tabela 5).

6. Diagnóstico de FIV:

A detecção de anticorpos para o FIV a partir do plasma ou do soro foi efectuada no Dia 0 em todos os animais e no dia 65 nos gatos do grupo FIV e do grupo dos Co-Infectados, utilizando um kit comercial de ELISA (Virachek®/FIV, Synbiotics) para detecção de anticorpos (Ac) específicos do vírus, de acordo com as instruções do fabricante.

Os poços estão revestidos Proteína A, uma proteína com alta afinidade para a região Fc das imunoglobulinas. A incubação simultânea da amostra com uma proteína viral conjugada com uma enzima (horseradish peroxidase) permite a formação de complexos específicos Ag/Ac e a sua posterior ligação à proteína A imobilizada. Após lavagem o péptido viral que não está ligado aos anticorpos é eliminado. A revelação é realizada pela adição do substrato enzimático com o cromogénio. A presença de complexos Ag/Ac específicos fixos ao poço pela ligação da região Fc dos Ac à Proteína A é visualizada pelo desenvolvimento de uma cor azul (amostra positiva). Uma amostra negativa é incolor.

7. Diagnóstico de FeLV:

A detecção do antígeno p27 FeLV foi efectuada usando um kit comercial de ELISA (Virachek®/FeLV, Synbiotics), a partir do plasma ou soro. Foi efectuado a todos os gatos no Dia 0 e aos gatos do grupo FeLV e do grupo dos Co-Infectados no Dia 65.

Neste teste o poço está revestido com anticorpos contra a proteína p27 do FeLV. A amostra é incubada simultaneamente com um anticorpo monoclonal específico contra a proteína p27 viral conjugado com uma enzima (*horseradish peroxidase*). Após lavagem é adicionado o cromogénio e o substrato enzimático. Numa amostra positiva o Ag viral circulante liga-se aos Ac imobilizados e o complexo Ag/Ac primário é revelado pela ligação do conjugado enzimático e desenvolvimento de cor azul após adição do substrato e cromogénio. Uma amostra negativa será incolor.

8. Extracção de ácidos nucleicos:

8.1. Extracção de DNA:

Foi extraído DNA de amostras de sangue para a detecção de hemoparasitas e provírus. Para tal foi usado o kit comercial DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Alemanha).

As amostras são lisadas na presença de um tampão de lise celular e proteinase K. Após precipitação dos ácidos nucleicos por adição de etanol, a amostra é aplicada numa coluna de sílica, com alta afinidade para DNA desidratado. Após duas lavagens com tampões com alta concentração de etanol, o DNA é eluído pela aplicação de um tampão aquoso.

8.2. Extracção simultânea de DNA e RNA viral:

Foram co-extraídos DNA e RNA virais a partir das zaragatoas rectais para detecção de vírus que causam doenças no tracto gastrointestinal (FPV, FCoV) Para tal foi usado o kit comercial QIAamp® MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O princípio da extracção é equivalente ao referido no ponto anterior, embora os tampões de lise e as colunas utilizadas sejam adequadas à co-extracção de DNA/RNA viral a partir de materiais biológicos sem células.

Os ácidos nucleicos foram armazenados a -80°C até serem analisados.

9. PCR e QRT-PCR:

A pesquisa e quantificação viral foram realizadas pelas técnicas de PCR e QRT-PCR, após quantificação por espectrofotometria dos ácidos nucleicos presentes nas amostras originais (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific).

A detecção de FPV foi efectuada por PCR, para amplificação de um fragmento de 583bp incluído no gene *vp2* que codifica a proteína da cápside viral (Desario et al., 2005). A reacção foi realizada com a PCR Fidelity Taq 2x Master Mix (GEHealthcare), 50µM de *primer 555 forward* e de *primer 555 reverse* (Tabela 6), 2mM de MgCl₂ e 10ng de DNA. De forma a excluir contaminação no PCR que resultasse na amplificação de falsos positivos, foram realizados controlos negativos com água em substituição do DNA das amostras. A visualização dos produtos amplificados foi realizada após electroforese submarina, em gel de agarose a 2% em TAE (Tris-Acetato-EDTA) ao qual foi adicionado o corante Gel Red (Biotium) (2,5µg/100ml) e observação no aparelho MasterImage VDS (Pharmacia).

Para a detecção de FCoV e quantificação da carga viral a partir das zaragatoas rectais, foram calculados um par de *primers* e uma sonda *Taqman*® (tabela 6) utilizando o *software Primer Express* (Applied Biosystems), com base na sequência nucleotídica de 177bp incluída na região 3' UTR do FCoV (Herrewegh et al., 1995), previamente clonada no vector plasmídico pGEM (Duarte, Veiga & Tavares, 2009). A reacção foi efectuada com a *mix TaqMan®RNA-to-CT™ 1-Step Kit 2x* concentrada (Applied Biosystems), num volume total de

20 µl, com 3 µM de *forward primer*, 9 µM de *reverse primer*, 2.5 µM de sonda *Taqman*[®] e 10 ng de RNA viral no termociclador *real time 7300* (Applied Biosystems). O cálculo da carga viral foi efectuado pelo *software 7300 System SDS* com base nos Ct de diluições seriadas na base 10, do plasmídeo recombinante para gerar uma curva *standard* com o *correlation efficiency* de $r^2=0.997$.

Tabela 3 - Parâmetros de avaliação do quadro clínico de cada gato e respectiva pontuação.

Parâmetro avaliado	Pontuação	Parâmetro avaliado	Pontuação
Úlceras orais/Gengivite:		Mucosas:	
- muito exuberante e/ou tártaro dentário abundante	+2	- palidez severa	+2
- pouco exuberante mas, presente e/ou algum tártaro dentário	+1	- discretamente pálidas	+1
- sem evidência de lesões bucais	0	- rosadas	0
Granulomas orais/faucite:		Pêlo seco/seborreico:	
- muito exuberante	+2	- presente	+1
- presente/discreta hiperémia	+1	- ausente	0
- ausente	0		
Conjuntivite/alterações oftalmológicas:		Condição corporal:	
- Hiperémia conjuntival moderada a grave/conjuntivite bilateral/ queratite activa	+2	- 1/6, 2/6	+2
- Discreta hiperémia conjuntival/conjuntivite unilateral/queratite ligeira ou crónica	+1	- 3/6	+1
- ausente	0	- 4/6, 5/6, 6/6	0
Linfadenopatia:		Consistência fecal:	
- muito evidente	+2	- diarreica	+1
- presente, mas localizada	+1	- normal	0
- ausente	0		
Corrimento ocular:		Co-morbididades evidentes ao exame clínico:	
- muco-purulento	+2	- fraqueza e/ou prostração muito evidentes	+2
- seroso	+1	- presente	+1
- ausente	0	- ausente	0

A amplificação e quantificação do DNA dos provírus de FeLV foi também efectuada utilizando a metodologia *TaqMan*[®] (Tandon et al., 2005) (Tabela 6). As reacções foram realizadas no volume final de 20 µl, com a *mix TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix 2x*

concentrada (Applied Biosystems), 9 μ M de *primers forward* e *reverse*, 2,5 μ M de sonda *Taqman*[®]. A quantificação da carga viral foi efectuada como o descrito para o FCoV, com base em diluições seriadas do plasmídeo recombinante pGEM-FeLV-U5-LTR (Tandon et al., 2005; Laboratório Virologia FMV)

10. Análises hematológicas, proteinograma e parâmetros bioquímicos:

Os hemogramas, a quantificação das enzimas hepáticas - ALT e AST - e da função renal - ureia e creatinina - foram realizados no laboratório de análises clínicas do Hospital Escolar da FMV/UTL. O proteinograma foi efectuado pelo laboratório de análises clínicas veterinárias DNAtch (Lisboa, Portugal)

Tabela 4 - Primers, posição e tamanho dos fragmentos usados no PCR (FPV) e no QRT-PCR (FCoV e FeLV).

Vírus	Primer	Sequência (sentido 5'-3')	Posição	Fragmento (bp)
FPV ^a	555for	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	4003-4022	583
	555rev	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	4561-4585	
FCoV	Forward	TGGTCATCGCGCTGTCTACT	3'UTR	177
	Reverse	AGGGTTGCTTGTACCTCCTATTACA		
	Prob	TTGTACAGAATGGTAAGCAC ^a		
FeLV ^c	Forward exo	AACAGCAGAAGTTTCAAGGCC	U3 da LTR	21
	Reverse exo	TTATAGCAGAAAGCGCGCG	U3 da LTR	19
	Probe	CCAGCAGTCTCCAGGCTCCCA ^d	U3 da LTR	22

^a Desario et al., 2005

^c Tandon et al., 2005

^d A terminação 3' está ligada a um corante FAM; a terminação 5' está ligada ao corante TAMRA.

Tabela 5 – Ciclos de amplificação utilizados no PCR e no QRT-PCR.

Vírus	Transcrição reversa	Desnaturação inicial	Desnaturação	Encadeamento	Extensão	Extensão final
FPV ^a		94°C/10 min.	94°C/30 seg.	50°C/1 min.	68°C/1min 40 ciclos	68°C/10min
FCoV	48°C/15min.	95°C/10 min.		95°C/15 seg.	60°C/1 min. 50 ciclos	
FeLV ^b	50°C/30min.	95°C/10 min.		95°C/15 seg.	60°C/1min. 45 ciclos	

^a Desario et al., 2005

^b Tandon e al., 2005

11. Análise estatística:

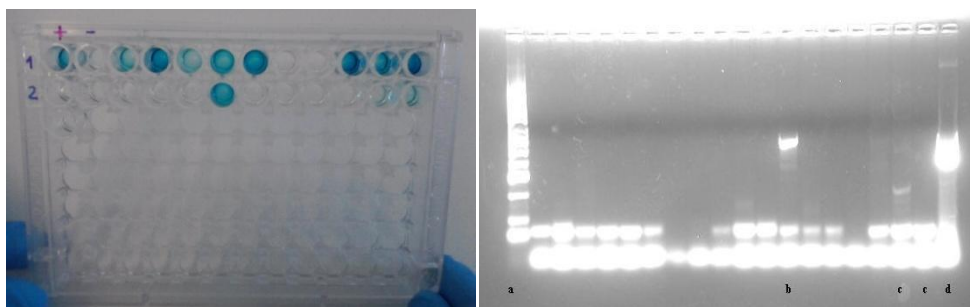
A análise estatística foi realizada através do *software Stata version 11* (Stata Corporation, College Station, Texas). Foram efectuadas as análises de Kruskal-Wallis para a análise estatística do proteinograma. Este teste foi usado já que foi comparada uma variável nominal – o grupo – com uma variável numérica – os valores da albumina, das diferentes globulinas e das proteínas totais. Este é um método não paramétrico semelhante à ANOVA *one-way* que compara a média de mais de dois grupos e determina se são iguais. Devido à distribuição não normal dos parâmetros do proteinograma a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, menos preciso que o método ANOVA.

RESULTADOS:

A União Zoófila tinha nos seus gatis cerca de 83 gatos. Todos os gatos ao darem entrada neste abrigo são testados para FIV e FeLV e separados em gatis diferentes conforme a sua positividade para FIV, FeLV ou ausência destes vírus. Após confirmação laboratorial por ELISA ficaram disponíveis para o presente estudo 7 FIV, 6 FeLV e 3 co-infectados.

Todos os animais foram re-testados ao dia 65 mantendo os resultados encontrados ao Dia 0, com excepção de um gato (FeLV positivo) que mais tarde viria a falecer.

Imagem 1 - Teste ELISA para anti-corpos de FIV (à esquerda), o primeiro poço corresponde ao controlo positivo e o segundo poço o controlo negativo, os restantes são as amostras correspondentes aos gatos em estudos. PCR de Parvovírus (à direita), a) marcador de peso molecular; b) resultado positivo; c) controlos negativos; d) controlo positivo.



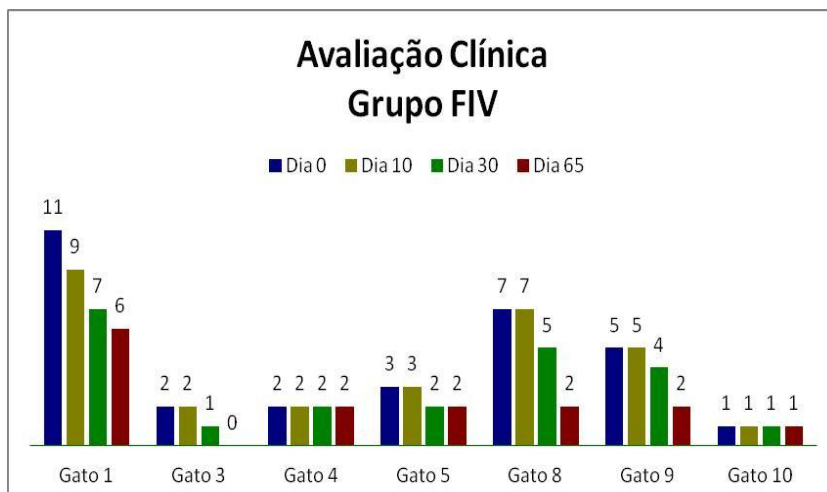
1. Exame clínico:

A avaliação clínica efectuada ao longo do tratamento com reFeIFN- ω permitiu a seguinte avaliação:

No grupo do FIV (gráfico 1) 71,4% (5/7) gatos melhoraram a sua avaliação clínica após o tratamento com reFeIFN- ω , 28,6% (2/7) mantiveram o valor encontrado ao Dia 0. Nenhum gato piorou (gráfico 1) a sua condição inicial.

Os sinais clínicos que ocorreram com maior frequência foram as úlceras orais/gengivite, sendo que no Dia 0 representou 86% das afecções presentes, seguido pelos granulomas orais (43% das afecções observadas no Dia 0). No Dia 65, as úlceras orais/gengivite e os granulomas orais mantiveram-se como as afecções mais presentes no grupo do FIV, no entanto, a sua frequência baixou de 43% para 29%. Todos os restantes sinais clínicos melhoraram ao longo do tratamento com o reFeIFN- ω (tabela 2).

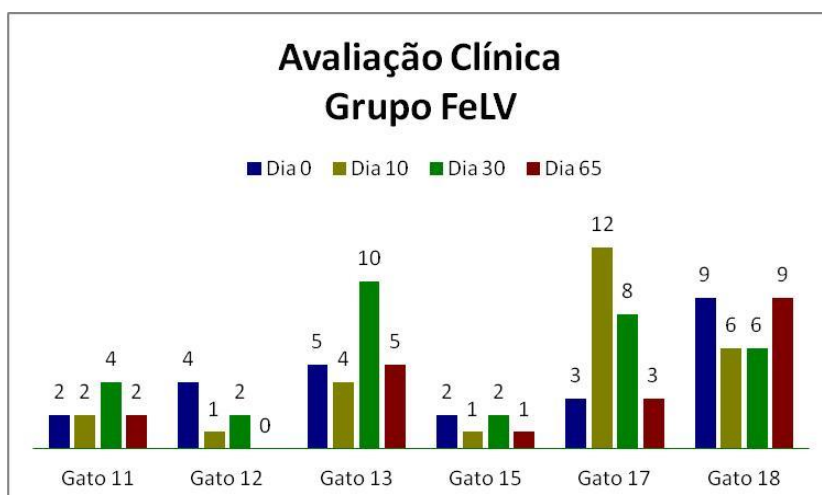
Gráfico 1 - Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com rFeIFN- ω do grupo FIV.



A média da avaliação clínica dentro deste grupo foi diminuindo ao longo do tempo, no Dia 0 foi de 4,57; no Dia 10 foi de 4,14; no Dia 30 foi de 1,89 (tabela 1). A diferença entre o valor da média obtida no Dia 0 e no Dia 65 foi estatisticamente significativa ($p=0,043$).

No grupo do FeLV, por sua vez, a evolução não foi tão evidente. Ainda assim 50% (3/6) dos gatos melhoram a sua avaliação entre o Dia 0 e o Dia 65; 33,3% (2/6) dos gatos mantiveram o valor da sua avaliação clínica e 16,6% (1/6) dos gatos pioraram ao longo do tratamento com rFeIFN- ω (gráfico 2). Neste grupo, os sinais clínicos com maior frequência no Dia 0 foram as úlceras orais/gengivite com 75% de frequência e as co-morbilidades com 42% de frequência. Ambos estes sinais tiveram evolução positiva, mais evidente nas úlceras orais/gengivite (tabela 2).

Gráfico 2 – Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com rFeIFN- ω do grupo FeLV.



No geral, todos os sinais clínicos sofreram uma evolução positiva ao longo do tratamento, as exceções foram a conjuntivite e a condição corporal, ambos com uma frequência de 8% ao Dia 0 e uma frequência de 17% e 25%, respectivamente, ao Dia 65 (tabela 2). No entanto, estas evoluções negativas não foram estatisticamente significativas.

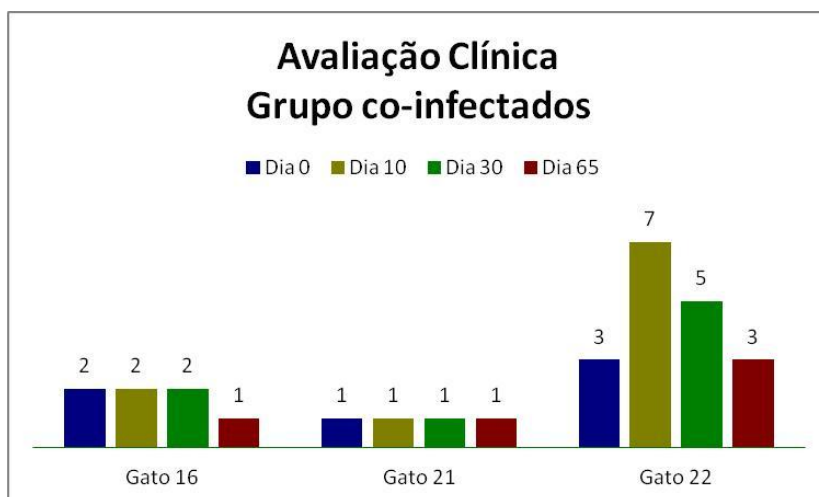
A média da avaliação clínica evoluiu de 4,5 valores no Dia 0 para 2,5 valores no Dia 65 (tabela 1). Esta variação não foi estatisticamente significativa.

Tabela 6 - Estatística descritiva quanto à avaliação clínica dos grupos FIV, FeLV e Co-Infectedos obtida nos dias de observação, dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65.

		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Dia 0	<i>FIV</i>	0	13	3	4,57	
	<i>FeLV</i>	2	13	3	4,50	3,507
	<i>Co-Infectedos</i>	0	2	1	1,00	1,000
Dia 10	<i>FIV</i>	0	10	3	4,14	
	<i>FeLV</i>	2	10	3,5	5,50	4,806
	<i>Co-Infectedos</i>	1	7	2	3,33	3,215
Dia 30	<i>FIV</i>	0	8	2	3,14	
	<i>FeLV</i>	2	8	6,5	6,33	3,559
	<i>Co-Infectedos</i>	1	5	2	2,67	2,082
Dia 65	<i>FIV</i>	0	6	2	1,86	
	<i>FeLV</i>	0	6	2,5	2,50	1,871
	<i>Co-Infectedos</i>	0	3	1	1,33	1,528

No grupo dos gatos Co-Infectedos 66,7% (2/3) melhoraram a sua avaliação clínica entre os Dias 0 e 65 e 33,3% (1/3) mantiveram (gráfico 3). Os sinais clínicos com maior frequência ao Dia 0 foram as úlceras orais/gengivite (67%) e os granulomas orais (33%) (tabela 2). Ambos os sinais clínicos melhoraram ao longo do tratamento com reFeIFN- ω .

Gráfico 3 - Pontuação individual dos gatos em estudo na avaliação clínica ao longo da terapêutica com reFeIFN- ω do grupo Co-Infectedos.



A evolução do valor médio da avaliação dentro deste grupo não foi estatisticamente significativa (tabela 1).

Tabela 7 - Classificação clínica absoluta (VA) e em percentagem (%), nos grupos FIV, FeLV e Co-Infectados. A evolução (Evo.) entre o dia 0 e o dia 65 é assinalada pelo sinal (+) para uma evolução positiva, (0) para uma evolução neutra e (-) para uma evolução negativa

	FIV					FeLV					Co-infectados				
Sinais clínicos	Dia 0 VA		Dia 65 VA		Evo.	Dia 0 VA		Dia 65 VA.		Evo.	Dia 0 VA		Dia 65 VA		Ev.
Úlceras orais/gengivite	12	86	6	43	+++	9	75	5	42	++	4	67	1	17	++
Granulomas orais	6	43	2	14	++	2	17	1	8	+	2	33	1	17	0
Conjuntivite	2	14	0	0	+	1	8	2	17	-	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	1	7	0	0	+	2	17	0	0	+	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	7	1	7	0	4	33	0	0	++	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	2	14	1	7	+	1	8	0	0	+	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	1	8	0	0	+	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreico	1	7	1	7	0	3	25	0	0	+	1	17	0	0	+
Condição corporal	5	36	2	14	+	1	8	3	25	-	1	17	1	17	0
Consistência fecal	1	7	0	0	+	3	25	1	8	+	1	17	0	0	+
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	1	8	0	0	+	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	2	14	2	14	0	5	42	3	25	+	1	17	1	17	0

2. Resultados Laboratoriais

2.1. Análises hematológicas

No grupo do FIV, quanto à concentração de eritrócitos, no Dia 0, todos os gatos se encontravam dentro do intervalo de referência, apesar de ter havido variações não significativas ao longo do tratamento. As exceções foram o gato 9 com um valor acima do normal no Dia 30 e o gato 8 com um valor ligeiramente inferior ao limite de referência no Dia 65. Quanto ao hematócrito, todos os gatos, ao Dia 0, tiveram valores dentro do intervalo de referência; o gato 1 e 5 no Dia 10 e o gato 5 no Dia 30 tiveram um hematócrito abaixo do valor de referência, mas não foi acompanhado por uma baixa na concentração de eritrócitos; já o gato 8, no Dia 65, teve não só o hematócrito como os eritrócitos abaixo do valor de referência.

Gráfico 4 - Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 - 10,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

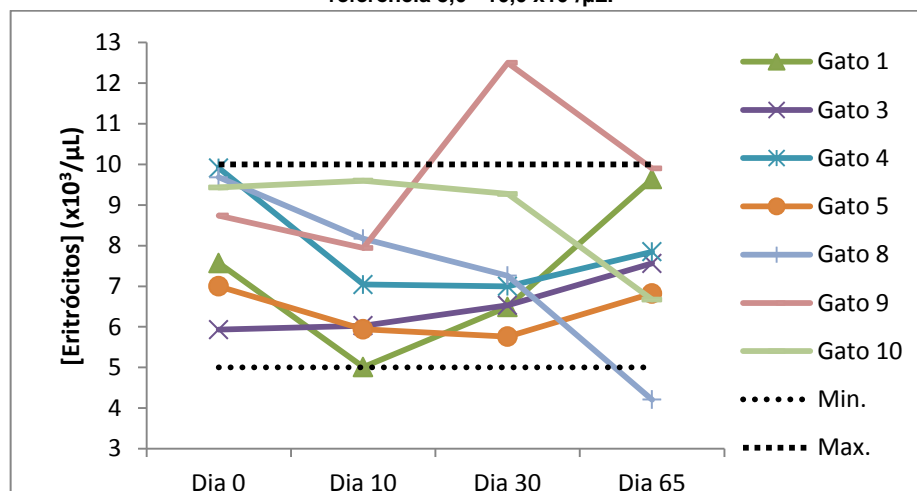
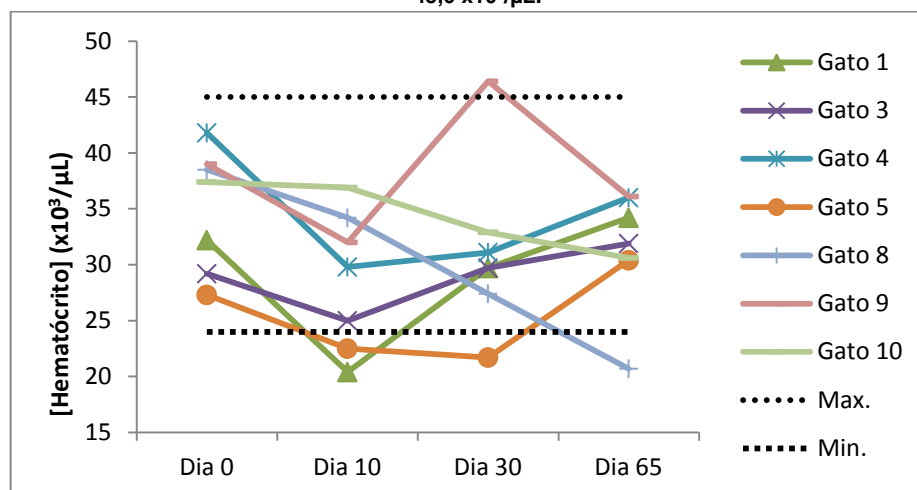


Gráfico 5 - Variação do hematócrito a nível individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 - 45,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$.



Ainda no grupo do FIV, a concentração de leucócitos em todos os gatos, encontrou-se sempre dentro dos valores de referência, tanto do Dia 0 como ao longo do tratamento. A exceção foi o gato 5 que apresentou uma ligeira leucocitose no Dia 0 e no Dia 30. A concentração de linfócitos, no Dia 0, esteve dentro do intervalo de referência em todos os gatos, com exceção do gato 5 que no Dia 0, apresentou leucocitose; o gato 1 e o gato 3 apresentaram uma ligeira linfopénia ao Dia 65.

Gráfico 6 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 - 19,5 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

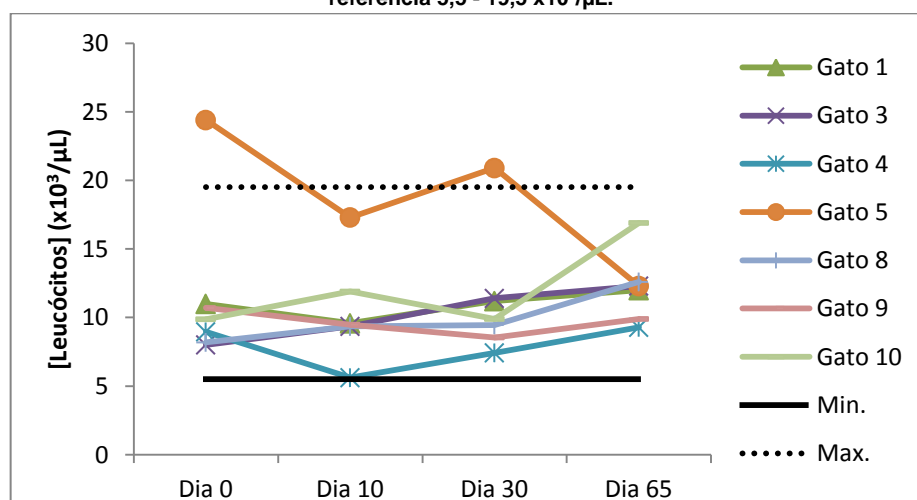


Gráfico 7 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo FIV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 - 7000/ μ L.

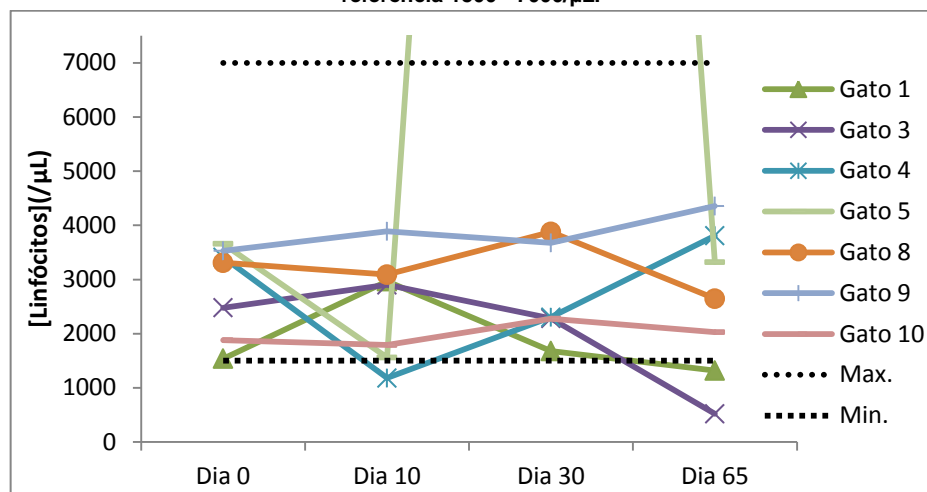
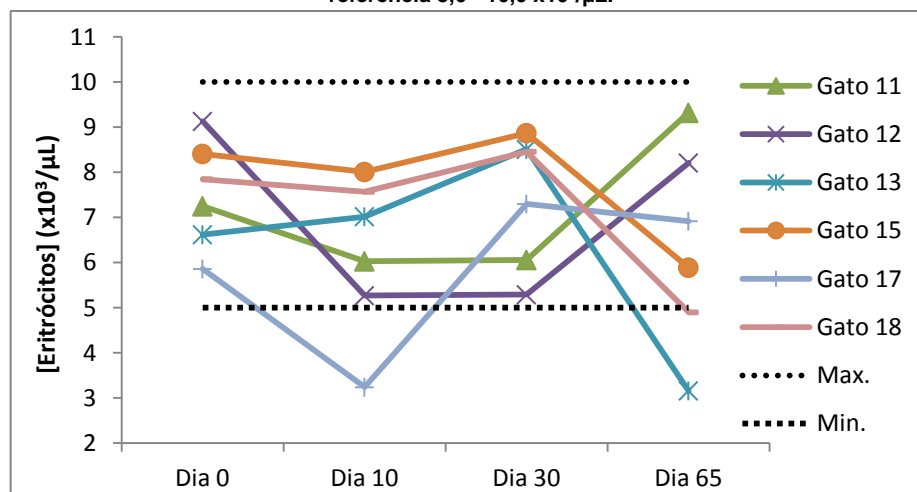


Gráfico 8 - Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 - 10,0 $\times 10^3$ / μ L.



No grupo FeLV, a concentração de eritrócitos esteve dentro do valor de referência para todos os gatos e assim se manteve ao longo do tratamento para a maioria dos gatos. As exceções foram o gato 17 e o gato 13 com concentrações abaixo do valor de referência no Dia 10 e no Dia 65, respectivamente. Tanto o gato 17 como o gato 13 tiveram valores de hematócrito igualmente baixos nos dias referidos para cada indivíduo. O hematócrito esteve igualmente abaixo dos valores de referência no Dia 65 nos gatos 15 e 18; os restantes gatos mantiveram o valor de hematócrito dentro do normal ao longo de todo o tratamento.

Gráfico 9 - Variação do hematócrito a nível individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 - 45,0 x10³/μL.

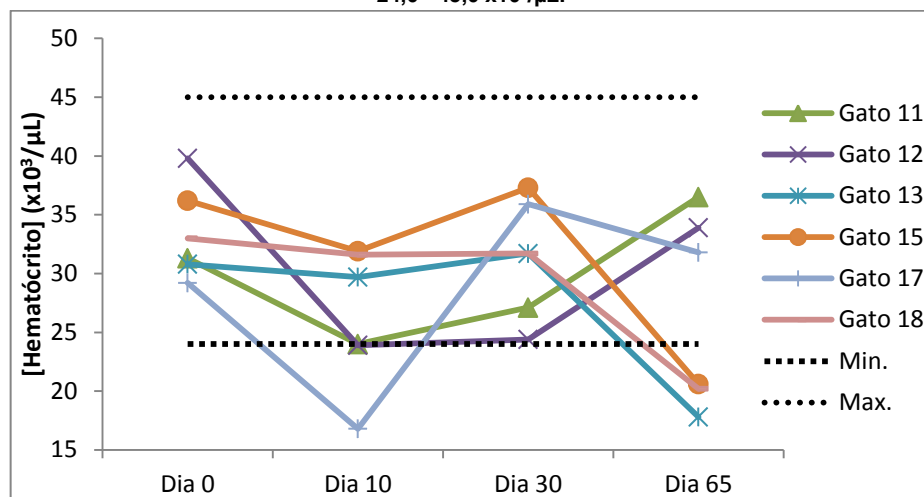
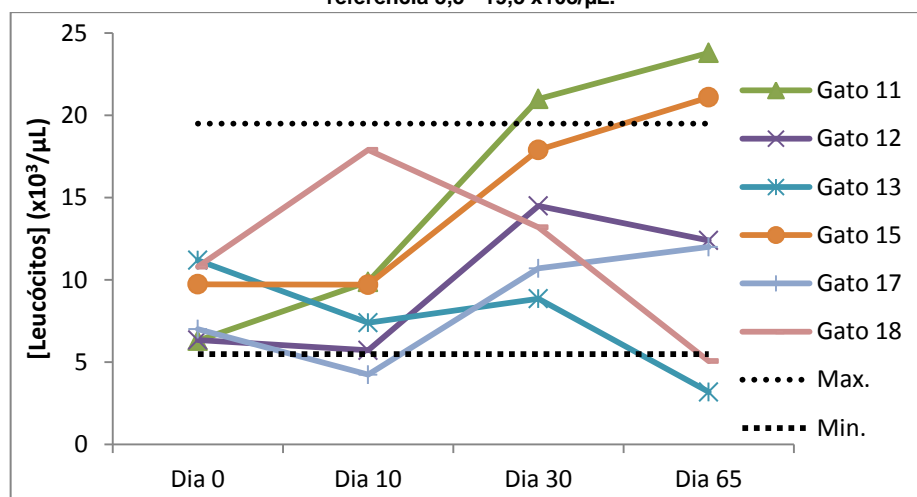


Gráfico 10 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 - 19,5 x10³/μL.



Quanto à concentração de leucócitos no grupo FeLV, no Dia 0, todos os gatos apresentaram valores dentro do intervalo de referência. No Dia 10, apenas o gato 17 mostrou um valor abaixo do intervalo de referência; por seu lado os gatos 11 e 15 tiveram valores crescentes de leucócitos ao longo do tempo, apresentando valores compatíveis com leucocitose nos Dias 30 e 65 e apenas no Dia 65, respectivamente. O gato 13, no Dia 65, encontrava-se leucopénico.

A concentração de linfócitos, no Dia 0, foi normal para todos os gatos, excepto para o gato 12 que se encontrava ligeiramente linfopénico. No Dia 10, apenas o gato 17 teve um valor fora do intervalo de referência, encontrando linfopénico. O gato 13 apresentou uma evidente linfocitose ao Dia 30. Este mesmo gato, no Dia 65, encontrava-se linfopénico, assim como o gato 17 e 18.

No grupo dos Co-Infectados, a contagem de eritrócitos aumentou no gato 16 e no gato 21, no entanto, apenas o gato 16 obteve igualmente um valor de hematócrito acima do valor de

referência. O gato 22 apresentou o hematócrito abaixo do valor de referência no Dia 30 e uma concentração de eritrócitos ligeiramente superior ao normal no Dia 65.

As concentrações de leucócitos e de linfócitos estiveram, em todos os gatos e ao longo do tratamento sempre dentro do intervalo de referência; a única exceção foi o gato 21 com linfopênia no Dia 30.

a exceção foi a variação da média de leucócitos nos grupos FIV e FeLV com um valor superior ao Dia 65 do que ao Dia 0, mas sempre dentro do intervalo de referência.

Gráfico 8 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo FeLV ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 - 7000/ μ L.

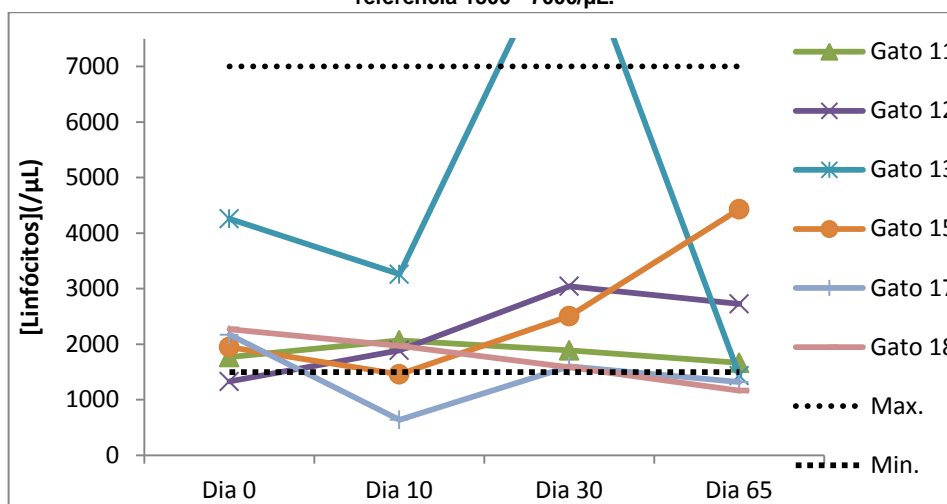
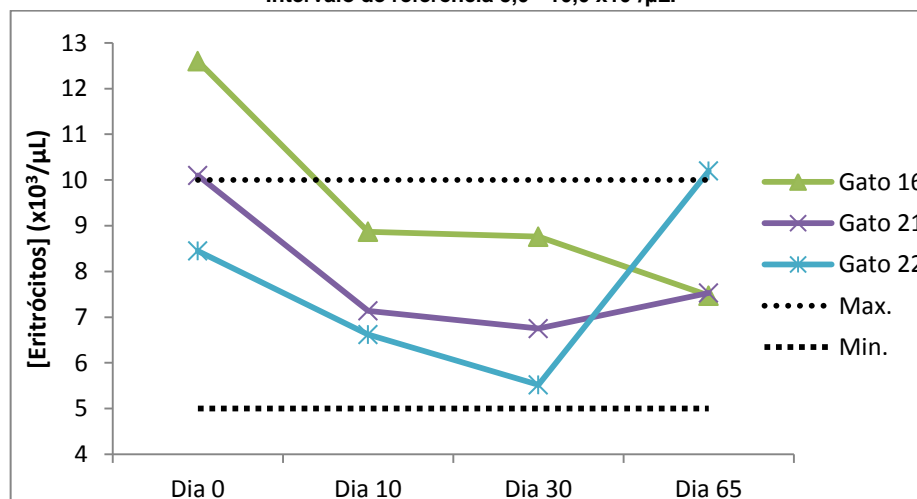


Gráfico 12 - Variação da concentração de eritrócitos individual no grupo Co-Infectados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,0 - 10,0 $\times 10^3$ / μ L.



Em todos os grupos a média dos valores do hemograma apresentou-se dentro do intervalo de referência tanto no Dia 0 como no Dia 65; a exceção foi a média da concentração de eritrócitos no Dia 0, ligeiramente superior. A variação da média dos vários parâmetros do hemograma entre o Dia 0 e 65, foi em geral negativa, ou seja, a média do Dia 65 foi mais baixa que no Dia 0, apesar disto apresentaram-se sempre dentro do intervalo de referência; Em todos os grupos e em todos os parâmetros do hemograma, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas no Dia 0 e no Dia 65.

Gráfico 13 - Variação do hematócrito a nível individual no grupo Co-Infetados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 24,0 - 45,0 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

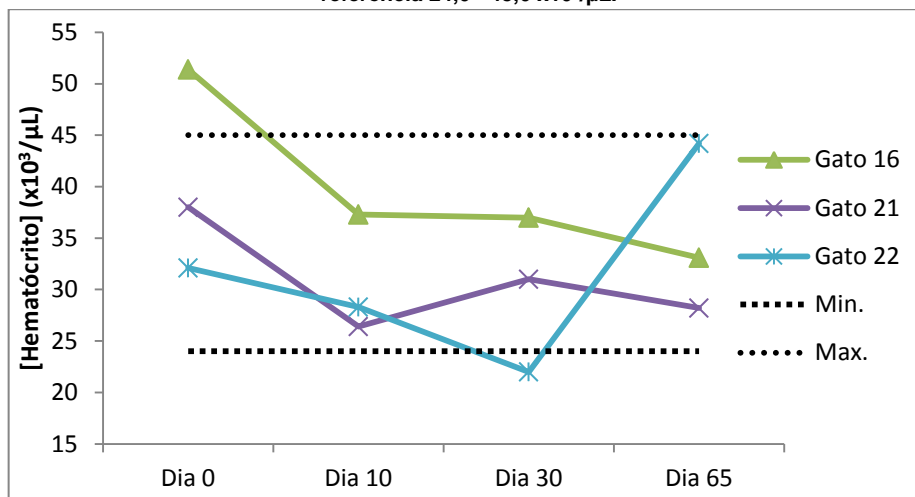


Gráfico 14 - Variação da concentração de leucócitos individual no grupo Co-Infetados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 5,5 - 19,5 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

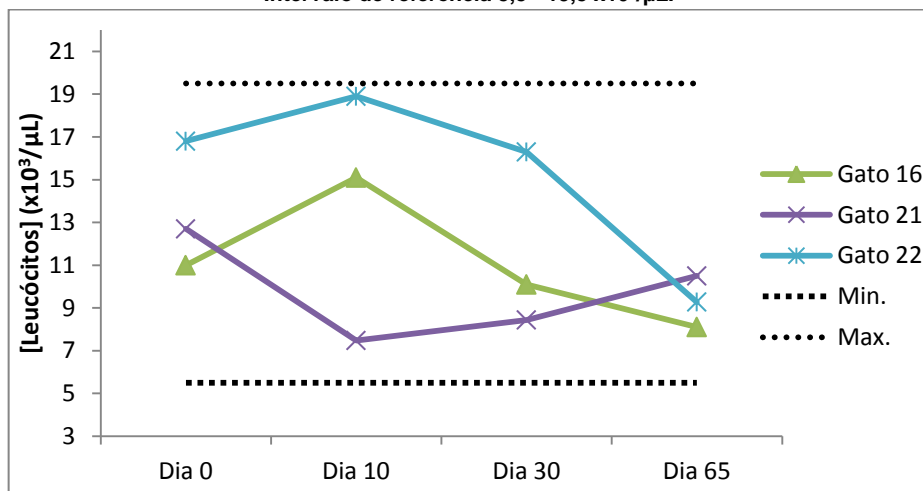
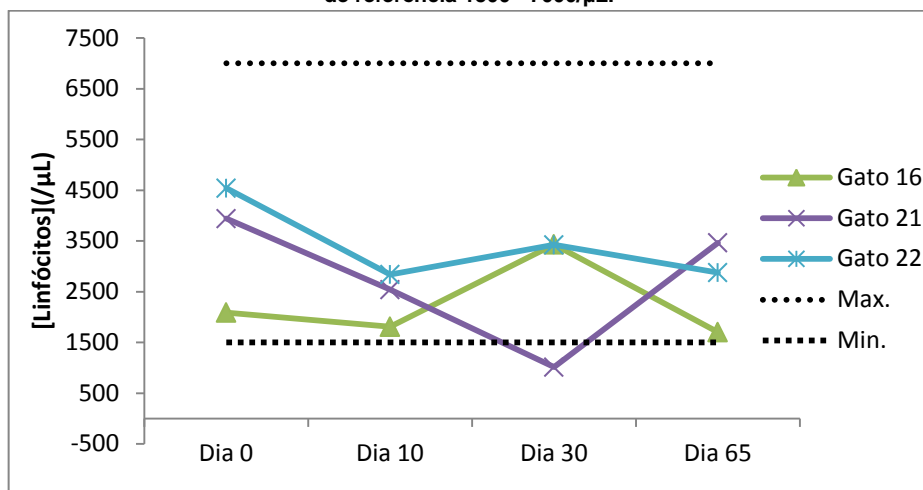


Gráfico 9 - Variação da concentração de linfócitos individual no grupo Co-Infectedados ao longo do tratamento. Intervalo de referência 1500 - 7000/ μ L.



2.2. Parâmetros bioquímicos

Nas análises bioquímicas, tirando algumas exceções, os valores detectados encontravam-se sempre dentro dos intervalos de referência. Não houve nenhum gato que manifestasse valores alterados nas duas análises hepáticas ou nas duas análises da função renal simultaneamente.

Apesar disto, destacaram-se os seguintes gatos: gato 1, que no Dia 0 apresentava os valores da ALT aumentados, no entanto, no Dia 65 estava normalizado; gato 3, cujo valor da ALT estava aumentado tanto no Dia 0, assim como no Dia 65, a creatinina esteve aumentada apenas no Dia 0; o gato 11, tinha os valores da ureia aumentados no Dia 65; e o gato 16, que teve o valor da creatinina aumentado no Dia 0, no Dia 65 este valor já se encontrava dentro dos valores padrão.

2.3. Proteinograma:

No grupo FIV, a concentração de albumina apresentou valores dentro do intervalo de referência no Dia 0. No Dia 65, o gato 3 e o gato 4 apresentaram hiperalbuminémia (tabela 4). A média de todos os gatos deste grupo foi normal tanto no Dia 0 como no Dia 65, tendo um valor mais elevado no Dia 65 (tabela 4); ao Dia 10 e ao Dia 30, a média da concentração de albumina esteve acima do valor de referência, o valor foi mais elevado no Dia 30 (gráfico 16).

A concentração de globulina- α 1 nos Dias 0, 10 e 30 esteve abaixo do valor de referência em todos os gatos do grupo FIV, embora, no Dia 65, os valores já se encontrarem dentro do intervalo de referência; apenas o gato 8, 9 e 10 mantiveram a hipoglobulinémia- α 1 (tabela 4) (gráfico 17).

Tabela 8 - Máximo, mínimo, média e variação desta, no dia 0 e 65, dos vários parâmetros do hemograma nos grupos FIV, FeLV e Co-Infectados.

		Máximo		Mínimo		Média		Variação
		Dia 0	Dia 65	Dia 0	Dia 65	Dia 0	Dia 65	
FIV	Eritrócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9,91	9,9	5,93	4,21	8,32	7,45	↓
	Hematócrito ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	41,8	36,1	27,3	20,7	34,94	30,74	↓
	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	24,4	16,9	8,01	9,29	11,59	12,18	↑
	Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	3660	4356	1540	520	2779	2542	↓
FeLV	Eritrócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9,13	9,32	5,86	3,16	7,51	6,36	↓
	Hematócrito ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	39,8	36,5	29,2	17,8	33,66	26,89	↓
	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11,2	23,8	6,31	3,19	8,62	13,07	↑
	Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	4260	4431	1330	1166	2417,25	2293	↓
Co-Infectados	Eritrócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12,6	10,2	8,45	7,47	10,44	8,57	↓
	Hematócrito ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	51,4	44,2	32,1	28,2	41	35,58	↓
	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,8	10,5	11	8,11	13,66	9,3	↓
	Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	4540	3465	2090	1703,1	3440	2642,6	↓

Em todos os gatos do grupo FIV a concentração de globulina- α_2 apresentou-se aumentada no Dia 0 e no Dia 65, à exceção do gato 10 que exibiu um valor normal (tabela 4). A média das concentrações esteve sempre acima do intervalo de referência subindo ao longo do tempo (gráfico 18) (tabela 4).

Quanto à concentração de globulina- β , esta encontrava-se abaixo do intervalo de referência em todos os gatos do grupo FIV no Dia 0, com a exceção dos gatos 1 e 9 com valores normais; no Dia 65, os gatos 3, 4 e 9 apresentaram valores dentro do intervalo de referência, enquanto os restantes gatos tiveram valores abaixo do mesmo (tabela 4). A média das concentrações da globulina- β foi inferior ao intervalo de referência no Dia 0, subindo para valores normais no Dia 10 e 30; no Dia 65 este valor voltou a estar abaixo do intervalo de referência, no entanto, foi superior ao do Dia 0 (gráfico 19).

Tabela 9 - Resultados do Proteinograma no dia 0 e dia 65 dos gatos do grupo FIV, média e variação da média entre o dia 0 e o dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referência (g/dL).

		<i>Gato 1</i>	<i>Gato 3</i>	<i>Gato 4</i>	<i>Gato 5</i>	<i>Gato 8</i>	<i>Gato 9</i>	<i>Gato 10</i>	<i>Média</i>	<i>Variação da média</i>
Albumina	Dia 0	3,3	3,6	3,3	3	3,6	3	3,2	3,29	↑
(2,1 – 4)	Dia 65	3,2	4,6	4,3	2,8	2,9	2,5	3,4	3,39	
Globulina-α1	Dia 0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0,04	↑
(0,2 – 1,1)	Dia 65	0,9	0,3	0,3	0,2	0,1	0	0,1	0,27	
Globulina-α2	Dia 0	1,6	1,5	1,7	2,1	1,6	3,5	1,7	1,96	↑
(0,4 – 0,9)	Dia 65	2,4	2,3	2,5	2,2	1,8	2,4	0,8	2,06	
Globulina-β	Dia 0	1,1	0,8	0,6	0,5	0,4	1,7	0,6	0,81	↑
(0,9 – 1,9)	Dia 65	0,6	1,3	1,3	0,5	0,4	0,4	1,4	0,84	
Globulina-γ	Dia 0	3	2	2,8	3,9	2	3,3	2,7	2,81	↑
(1,3 – 2,2)	Dia 65	3,3	3,5	3,2	4,3	2	2,3	2,7	3,04	
Proteínas Totais	Dia 0	9	7,9	8,5	9,6	7,6	11,6	8,2	8,91	↑
(5,7 – 7,9)	Dia 65	10,4	12	11,6	10	7,2	7,6	8,4	9,60	
Rel A/G	Dia 0	0,57	0,85	0,66	0,44	0,86	0,35	0,62	0,62	↓
(0,45 – 1,3)	Dia 65	0,45	0,62	0,62	0,39	0,66	0,47	0,69	0,55	

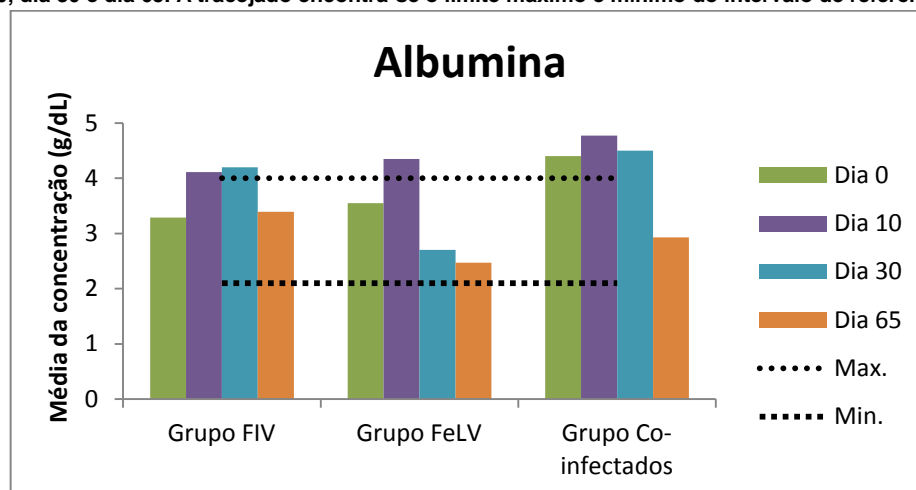
A concentração da globulina- γ , no Dia 0, foi superior ao intervalo de referência em todos os gatos, à excepção do gato 3 e 8; no Dia 65, o gato 8 manteve-se dentro do intervalo de referência enquanto todos os outros tiveram valores superiores ao mesmo (tabela 4). A hiperglobulinémia- γ foi consistente ao longo do tempo (gráfico 20).

Em relação às proteínas totais, todos os gatos apresentaram hiperproteinémia ao longo do tempo, com excepção do gato 8 no Dia 0, com uma concentração normal; (tabela 4), (gráfico 21).

A relação albumina/globulinas apresentou valores normais para todos os gatos, no Dia 0, à excepção dos gatos 5 e 9 com valores inferiores ao intervalo de referência; no Dia 65, o gato 5 manteve-se abaixo do limite inferior, enquanto os restantes gatos apresentaram valores normais (tabela 4). A média da relação albumina/globulina apresentou-se sempre dentro do intervalo de referência ao longo do tempo (gráfico 22), embora no Dia 65 a média deste parâmetro fosse ligeiramente inferior ao do Dia 0 (tabela 4).

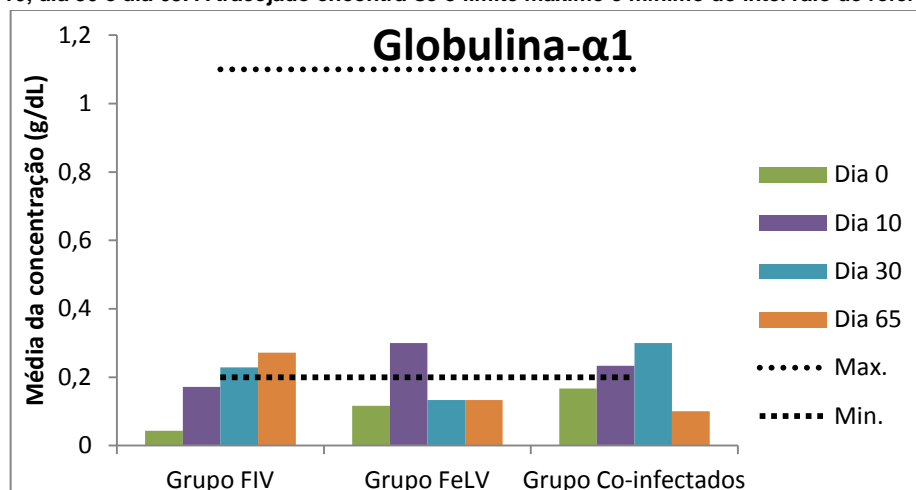
A variação da concentração média da globulina- α 1 antes e após o tratamento com reFeIFN- ω foi estatisticamente significativa ($p=0,048$). Os restantes parâmetros do proteinograma não se mostraram estatisticamente significativos entre o Dia 0 e o Dia 65.

Gráfico 16 - Média da concentração de Albumina no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



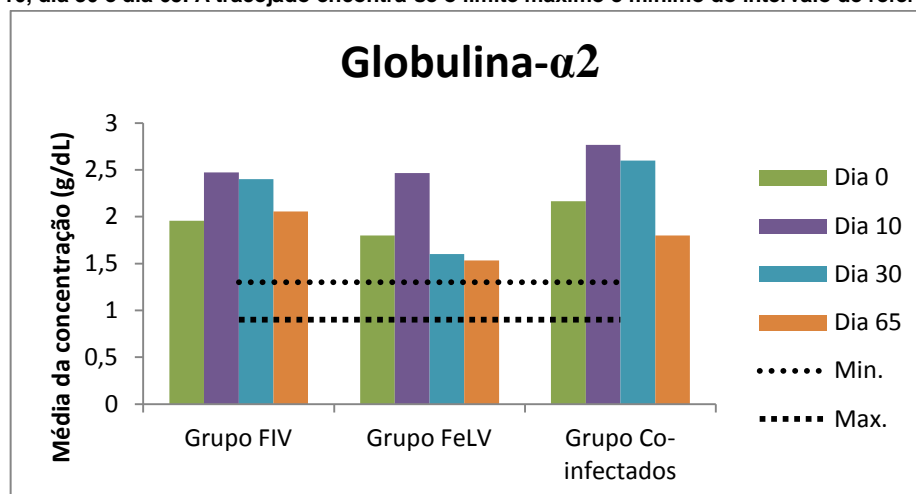
No grupo FeLV, a concentração de albumina foi normal em todos os gatos ao longo do tempo. As exceções foram o gato 12, no Dia 0, com hiperalbuminémia e o gato 11, no Dia 65, com hipoalbuminémia (tabela 4). A média das concentrações de albumina, no Dia 0, foi normal, no Dia 10 subiu acima do intervalo de referência, descendo para valores normais no Dia 30 e assim se mantiveram no Dia 65 (gráfico 16); apesar de ambos os valores serem normais, a média do Dia 0 foi superior à do Dia 65 (tabela 4).

Gráfico 17 - Média da concentração de Globulina- α 1 no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



A concentração de globulina- α 1, no Dia 0, encontrava-se abaixo do limite mínimo do intervalo de referência para todos os gatos do grupo FeLV, à exceção do gato 17 que se encontrava com uma concentração normal; no Dia 65, o único gato que obteve um valor normal foi o gato 18 (tabela 5). A média das concentrações esteve abaixo do intervalo de referência nos Dias 0, 30 e 65, embora no Dia 65 tenha sido superior à do Dia 0; a média do Dia 10 esteve dentro do intervalo de referência (gráfico 17).

Gráfico 18 - Média da concentração de Globulina- α 2 no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



Nos Dias 0 e 65 todos os gatos do grupo FeLV (tabela 5) apresentavam hiperglobulinemia- α 2. Assim, a média do grupo FeLV esteve acima do valor de referência em todos os dias de recolha de sangue, no entanto, a média do Dia 65 foi mais baixa quando comparada com a de Dia 0 (gráfico 18).

Quanto à concentração de globulina- β , todos os gatos apresentavam hipoglobulinemia- β nos Dias 0 e 65; a excepção foi o gato 5 que no Dia 0 obteve um resultado normal (tabela 5); a média das concentrações apenas esteve dentro do intervalo de referência no Dia 10, enquanto, nos Dias 0, 30 e 65 estiveram abaixo do limite inferior; a concentração obtida no Dia 65 foi inferior à do Dia 0 (gráfico 19).

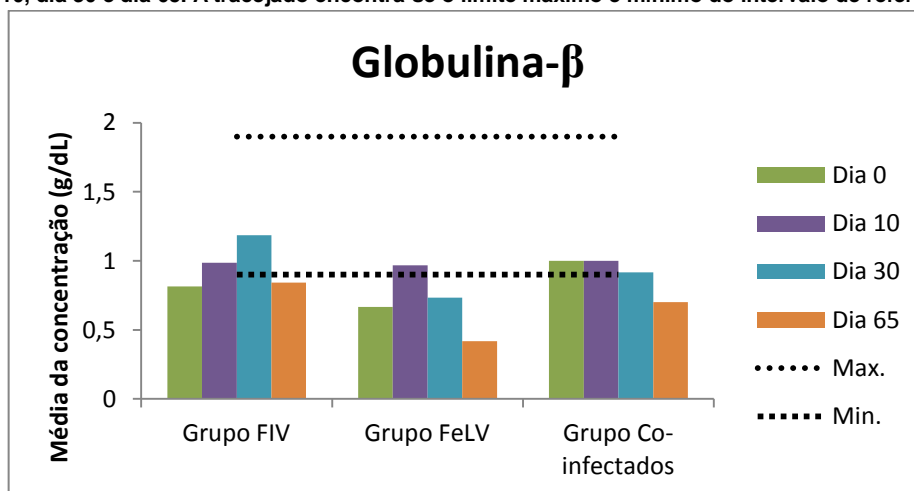
Tabela 10 - Resultados do Proteinograma no dia 0 e dia 65 dos gatos do grupo FeLV, média e variação da média entre o dia 0 e o dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referencia (g/dL).

		Gato11	Gato 12	Gato 13	Gato 15	Gato 17	Gato 18	Média	Variação da média
Albumina (2,1 – 4)	Dia 0	3,5	4,5	3,3	2,3	4	3,7	3,55	↓
	Dia 65	1,6	2,7	2,2	2,8	2,8	2,7	2,47	
Globulina- α 1 (0,2 – 1,1)	Dia 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,12	↑
	Dia 65	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,4	0,13	
Globulina- α 2 (0,4 – 0,9)	Dia 0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,5	2,2	1,80	↓
	Dia 65	1,7	1,4	1,7	1,5	1,3	1,6	1,53	
Globulina- β (0,9 – 1,9)	Dia 0	0,4	0,7	0,5	0,9	0,8	0,7	0,67	↓
	Dia 65	0,3	0,6	0,3	0,4	0,4	0,5	0,42	
Globulina- γ (1,3 – 2,2)	Dia 0	3	1,4	2,2	1,7	1,7	1,9	1,98	↓
	Dia 65	1,9	0,8	2,6	1,6	1,6	1,8	1,72	
Proteínas Totais (5,7 – 7,9)	Dia 0	9,2	8,8	7,5	6,4	8,4	9,6	8,32	↓
	Dia 65	5,6	5,6	6,8	6,4	6,4	7,6	6,40	
Rel A/G (0,45 – 1,3)	Dia 0	0,65	1,07	0,81	0,59	0,88	0,62	0,77	↓
	Dia 65	0,40	0,97	0,46	0,77	0,84	0,56	0,67	

No Dia 0, todos os gatos apresentaram resultados normais de globulina- γ , excepto o gato 11 com hiperglobulinemia- γ , este valor normalizou no Dia 65. Os gatos 12 e 13 apresentaram concentrações abaixo e acima do intervalo de referência, respectivamente, no Dia 65; os restantes gatos mantiveram-se com valores normais (tabela 5). A média das concentrações

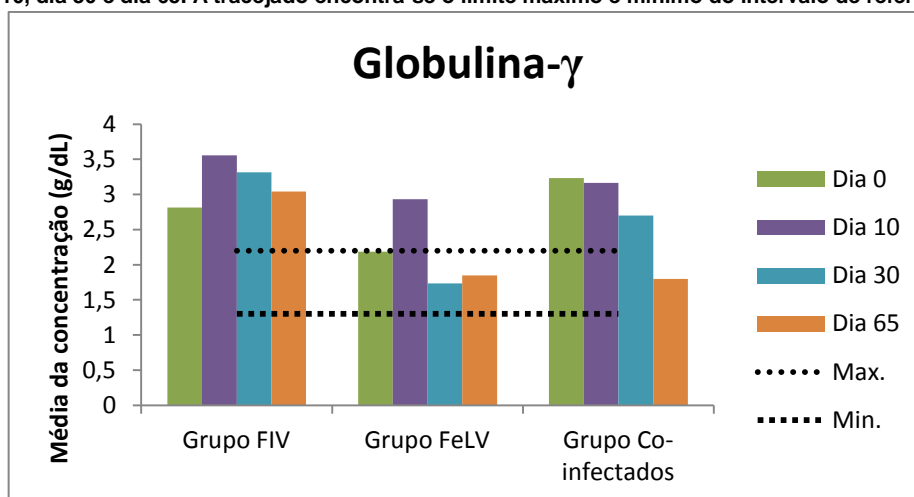
de globulina- γ só não esteve dentro do intervalo de referência no Dia 10; a média do Dia 65 foi superior à média do Dia 0 (gráfico 20).

Gráfico 19 - Média da concentração de Globulina- β no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



No Dia 0, o gato 13 e o gato 15 encontravam-se com valores normais de proteínas totais, os restantes gatos do grupo FeLV encontravam-se com valores acima do limite máximo; no Dia 65, o gato 11 e o gato 12 encontravam-se com concentração baixa de proteínas totais, mas os restantes gatos obtiveram valores normais (tabela 5). A média das concentrações esteve acima do intervalo de referência no Dia 0 e no Dia 10 e com valores normais nos Dias 30 e 65 (gráfico 21).

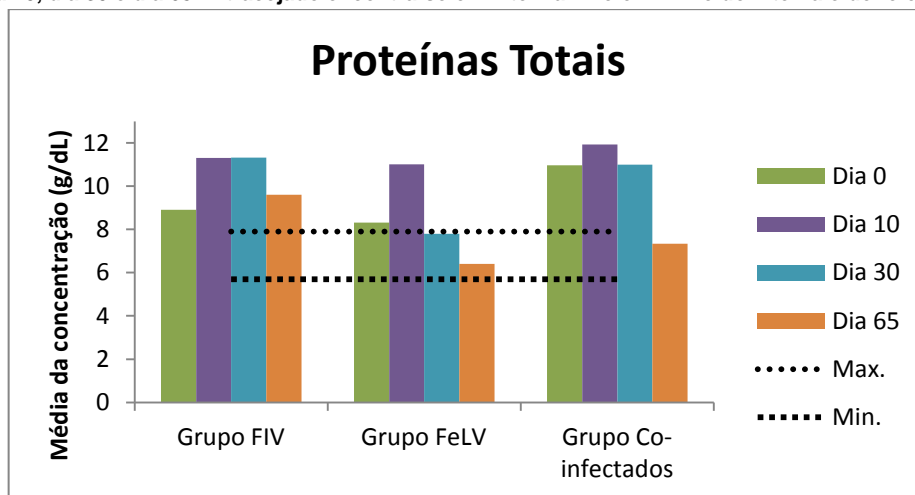
Gráfico 20 - Média da concentração de Globulina- γ no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



A relação albumina/globulinas, no Dia 0, apresentou valores normais para todos os gatos; no Dia 65, só o gato 11 baixou esta relação albumina/globulinas para valores inferiores ao intervalo de referência (tabela 5). A média da relação albumina/globulinas esteve sempre dentro do intervalo de referência, mas foi mais alta no Dia 0 do que no Dia 65 (gráfico 22).

A variação da concentração média da albumina ($p=0,046$), globulina- β ($p=0,027$) e proteína total ($p=0,042$) foi estatisticamente significativa entre o Dia 0 e o Dia 65.

Gráfico 21 - Média da concentração de Proteínas Totais no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



Quanto ao grupo dos gatos Co-Infectados, a concentração de albumina, no Dia 0, encontrava-se aumentada no gato 16 e gato 21; o gato 22 teve um valor normal; no Dia 65, todos os gatos obtiveram valores dentro do intervalo de referência (tabela 5). A concentração média teve valores acima do intervalo de referência nos Dias 0, 10 e 30 mas normalizou no Dia 65 (gráfico 16).

A concentração de globulina- α_1 , no Dia 0, esteve diminuída no gato 21 e no gato 22; o gato 16 apresentou um valor normal; no Dia 65, o gato 16 e 21 tiveram valores abaixo do limite mínimo aceite, enquanto o gato 22 apresentou uma concentração normal (tabela 6). A concentração média, no Dia 0, foi inferior ao intervalo de referência, com resultados normais nos Dias 10 e 30, mas voltou a diminuir para valores abaixo do intervalo de referência no Dia 65, com um valor ainda mais baixo que o verificado no Dia 0 (gráfico 17)

Tabela 11 - Resultados do Proteinograma no dia 0 e dia 65 dos gatos do grupo Co-Infetados, média e variação da média entre o dia 0 e o dia 65. Por baixo de cada parâmetro encontra-se o intervalo de referência (g/dL).

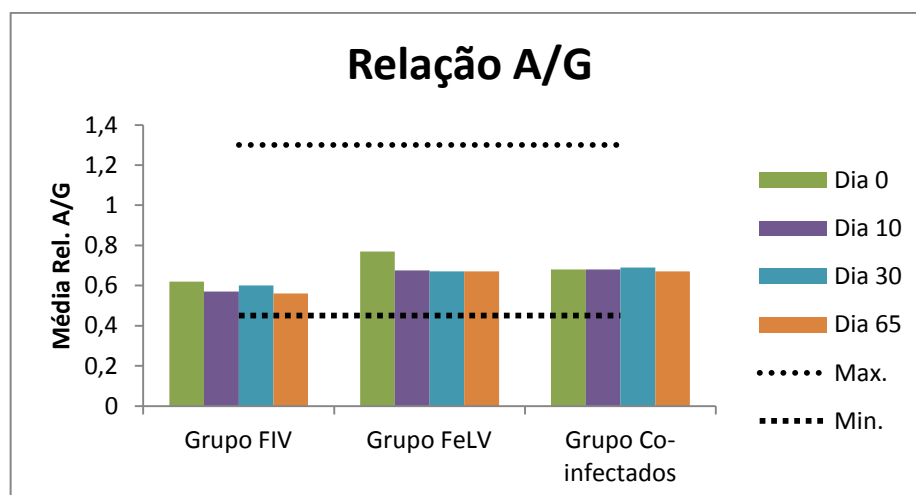
		Gato 16	Gato 21	Gato 22	Média	Variação da média
Albumina (2,1 – 4)	Dia 0	4,8	4,8	3,6	4,40	↓
	Dia 65	2,5	2,7	3,6	2,93	
Globulina- α 1 (0,2 – 1,1)	Dia 0	0,2	0,1	0,1	0,13	↓
	Dia 65	0	0,1	0,2	0,10	
Globulina- α 2 (0,4 – 0,9)	Dia 0	2,5	2,5	1,5	2,17	↓
	Dia 65	1,6	1,6	2,0	1,73	
Globulina- β (0,9 – 1,9)	Dia 0	0,8	1,3	0,9	1,00	↓
	Dia 65	0,3	0,8	1,0	0,70	
Globulina- γ (1,3 – 2,2)	Dia 0	4,2	3,3	2,2	3,23	↓
	Dia 65	2,0	2,2	1,2	1,80	
Proteínas Totais (5,7 – 7,9)	Dia 0	12,5	12	8,4	10,97	↓
	Dia 65	6,4	7,6	8,0	7,33	
Rel A/G (0,45 – 1,3)	Dia 0	0,62	0,64	0,78	0,68	↓
	Dia 65	0,60	0,57	0,83	0,67	

A concentração de globulina- α 2, no Dia 0, esteve aumentada em todos os gatos, assim como no Dia 65 (tabela 6). Por seu lado, a concentração média teve valores acima do intervalo de referência ao longo do tempo, mas a média desceu entre o Dia 0 e o Dia 65 (gráfico 18).

No Dia 0, o gato 21 e o gato 22 apresentaram uma concentração de globulina- β normal, enquanto o gato 16 registou um valor inferior ao padrão; no Dia 65, apenas o gato 22 normalizou, enquanto os gatos 16 e 21 apresentaram concentrações abaixo do intervalo de referência (tabela 6). A concentração média esteve dentro do intervalo de referência no Dia 0 e no Dia 10, mas desceu para valores inferiores ao mesmo no Dia 30 e no Dia 65 (gráfico 19).

A concentração de globulina- γ , no Dia 0, aumentou nos gatos 16 e 21; o gato 22 obteve uma concentração normal; no Dia 65, todos os gatos diminuíram a concentração de globulina- γ , os gatos 16 e 21 registaram valores normais, enquanto o gato 22 apresentou uma concentração abaixo dos valores de referência (tabela 6). A média das concentrações esteve sempre dentro do intervalo de referência, à excepção do Dia 10, em que os valores registados foram acima dos valores padrão; a média do Dia 65 foi mais baixa que a média do Dia 0 (gráfico 20).

Gráfico 22 - Média da relação Albumina/Globulinas no grupo do FIV, grupo do FeLV e grupo Co-infectados, no dia 0, dia 10, dia 30 e dia 65. A tracejado encontra-se o limite máximo e mínimo do intervalo de referência.



As proteínas totais, no Dia 0, aumentaram em todos os gatos, mas no Dia 65, todos os gatos diminuíram o seu valor; o gato 16 e 21 exibiram concentrações normais, o gato 22 apresentou um valor ligeiramente superior ao intervalo de referência (tabela 6). A concentração média esteve aumentada nos Dias 0, 10 e 30, mas normalizou no Dia 65 (gráfico 21).

Por último, a relação entre a albumina e as globulinas, no grupo Co-Infectados, tanto no Dia 0, como no Dia 65 manteve-se sempre dentro dos valores de referência para todos os gatos (tabela 6), assim como as concentrações médias (gráfico 22).

No grupo dos animais Co-Infectados não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros do proteinograma entre o Dia 0 e o Dia 65.

2.4. Carga de Provírus de FeLV:

Tanto no grupo FeLV como no grupo Co-Infectados, a carga de provírus de FeLV, no Dia 0, foi de magnitude bastante diferente entre os diferentes gatos, enquanto o gato 13, o gato 15 (grupo FeLV) e o gato 21 (grupo Co-Infectados) tiveram cargas virais de, respectivamente, 6, 40 e 20 provírus por 10ng de DNA; o gato 18 (grupo FeLV) teve 4 milhões de provírus por 10ng de DNA. Os restantes gatos ficaram entre estes dois valores (Tabela 15 e Tabela 16). No Dia 10, no grupo FeLV 44,44% (4/9) dos gatos aumentaram a sua carga viral, enquanto a mesma percentagem – 11,11% (1/9) – dos gatos mantiveram e diminuíram a carga viral. No Dia 30, a percentagem de gatos que aumentou a sua carga viral continuou a ser superior àquela de gatos que diminuíram ou mantiveram, 33,33%, 22,22% e 11,11%, respectivamente (Tabela 15). No Dia 65, esta tendência inverteu-se, havendo 33,33% de gatos que diminuíram a sua carga viral, 22,22% aumentaram e 11,11% mantiveram. (Tabela 15).

Tabela 12 - Comparação ao longo do tratamento das cargas virais de provirus de FeLV no grupo FeLV.

Gato	Dia 0 Carga Viral	Dia 10 Evolução	Dia 30 Evolução	Dia 65 Evolução/Carga Viral
11	2 000	→	↑ 1,5x	↑ 1,67x / 50 000
12	3 000	↑ 1,67x	↑ 16 000x	↑ 2,5x / 2 000 000 000
13	6	↓ 2	↑ 20x	↓ 50x / 1
15	40	↑ 5x	→	→ / 200
17	200 000	↑ 1,5x	↓ 3x	↓ 33,3x / 300
18	4 000 000	↑ 1,75x	↓ 1,17x	↓ 3x / 2 000 000

No grupo Co-Infectados, no Dia 10, 66,67% (2/3) aumentaram a sua carga viral e 33,33% (1/3) diminuíram. Nos Dias 30 e 65, a percentagem de gatos que diminuíram, aumentaram ou mantiveram a sua carga viral foi sempre a mesma, 33,33% (1/3).

A diferença da carga viral entre o Dia 0 e o Dia 65 não foi significativa tanto no grupo FeLV como no grupo Co-Infectados.

Tabela 13 - Comparação ao longo do tratamento das cargas virais de provirus de FeLV no grupo Co-Infectados.

Gato	Dia 0 Carga Viral	Dia 10 Carga Viral	Dia 30 Evolução	Dia 65 Evolução/Carga Viral
16	90 000	↑ 1,11x	→	↑ 2x / 200 000
21	20	↓ 0,5x	↑ 2x	→ / 20
22	50 000	↑ 1,2x	↓ 2x	↓ 1,5x / 20 000

2.5. Avaliação da excreção de vírus concomitantes do tracto digestivo

2.5.1. Parvovírus Felino

No Dia 0, apenas o gato 16 - gato co-infectado – teve um resultado positivo na detecção de DNA de Parvovírus. No entanto, nos exames seguintes - Dia 10, Dia 30 e Dia 65 - este gato negativou. Os restantes gatos tiveram um resultado sempre negativo.

4.5.2. Coronavírus Felino

No grupo FIV, os gatos 3 e 8 registaram sempre resultados negativos para Coronavírus. Os gatos 4 e 9, foram positivos no Dia 0. No Dia 65, não foi detectada excreção viral, ausente no gato 4 desde o Dia 30. Os gatos 1 e 10, apesar de ter sido detectada excreção deste vírus nas fezes destes gatos, a carga viral diminuiu entre o Dia 0 e o Dia 65. Neste grupo, apenas no gato 5 foi detectada excreção viral no Dia 0 e o Dia 65. No entanto, no Dia 10 e no Dia 30 este animal apresentou resultados negativos na excreção de coronavírus (tabela 7).

Tabela 14 - Resultados do QRT-PCR para coronavirus, grupo FIV.

	<i>Gato 1</i>	<i>Gato 3</i>	<i>Gato 4</i>	<i>Gato 5</i>	<i>Gato 8</i>	<i>Gato 9</i>	<i>Gato 10</i>
Dia 0	4 000	0	400 000	3 000	0	500 000	3 000 000
Dia 10	5 000	0	100 000	0	0	200 000	5 000 000
Dia 30	300 000	0	0	0	0	200 000	3 000 000
Dia 65	3 000	0	0	100 000	0	0	800 000

No grupo FeLV, o gato 12 apresentou resultados negativos em todos os dias de colheita, excepto no Dia 30. O gato 17 foi diminuindo a carga de excreção viral ao longo das colheitas, negativando ao Dia 65; já no gato 18 apenas foi detectada excreção no Dia 0. O gato 13 e 15, aumentaram a quantidade de vírus detectado entre os Dias 0 e 65; o gato 15, obteve valores mais altos no Dia 10 e no Dia 30 do que no Dia 65; e o gato 13 aumentou a sua excreção do Dia 0 para o Dia 10 e negativou a excreção viral no Dia 30 (tabela 8).

Tabela 15 - Resultados do QRT-PCR para coronavirus, grupo FeLV.

	<i>Gato 11</i>	<i>Gato 12</i>	<i>Gato 13</i>	<i>Gato 15</i>	<i>Gato 17</i>	<i>Gato 18</i>
Dia 0	400 000	0	200 000	0	50 000 000	3 000 000
Dia 10	10 000	0	1 000 000	60 000	15 000	0
Dia 30	60 000	20 000	0	20 000	6 000	0
Dia 65	70 000	0	2 000 000	400	0	0

No grupo dos Co-Infectados, o gato 16 diminui a excreção inicial de coronavírus ao Dia 10, negativando ao Dia 30. O gato 21 sem excreção ao Dia 0 e ao Dia 10, apresentou excreção de coronavírus nos Dias 30 e 65 (tabela 9).

Tabela 16 - Resultados do QRT-PCR para coronavirus, grupo Co-Infectados.

	<i>Gato 16</i>	<i>Gato 21</i>	<i>Gato 22</i>
Dia 0	80 000	0	100 000
Dia 10	3.000	0	500 000
Dia 30	0	4 000 000	300 000
Dia 65	0	2.000.000	2.000.000

A diferença entre Dia 0 e Dia 65 não é estatisticamente significativa, $p=0,34$.

DISCUSSÃO:

O sistema interferão é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra as infecções virais, sendo libertado por células infectadas, actuando sobretudo em células ainda não infectadas, alterando profundamente a sua fisiologia e interferindo com a replicação viral (Sen, 2001).

Quase todas as famílias de vírus de mamíferos têm mecanismos que os protegem dos efeitos do IFN, havendo um equilíbrio dinâmico entre ambos. Assim, a progressão das infecções virais resulta do balanço entre os mecanismos de evasão viral, nos quais se incluem a via do IFN, e a eficácia do Sistema Imunitário

Tanto o FIV como o FeLV, induzem especificamente uma imunossupressão nos hospedeiros infectados, que sem controlo poderá levar à morte dos animais, devido à incapacidade de produção de células de defesa e ao desenvolvimento de infecções oportunistas.

Na terapêutica destas retroviroses a utilização de imunomoduladores, nomeadamente o IFN, tem-se demonstrado uma mais-valia no seu controlo.

Collado e colaboradores (2007) estudaram o efeito dos vários tipos de interferão do grupo I a nível celular (*in vitro*), verificando que a sua utilização, leva a um aumento da apoptose nas células infectadas, contribuindo assim para a redução da quantidade de novas partículas virais. Outros autores verificaram uma franca melhoria da taxa de sobrevivência, sinais clínicos, parâmetros hematológicos (de Mari et al., 2004; Pedretti et al., 2006; Collado et al., 2007; Doménech et al., 2011) e da carga viral (Pedretti et al., 2006), em gatos tratados com IFN. Mais estudos parecem necessários para uma melhor compreensão dos efeitos do IFN na patofisiologia das infecções por FIV e/ou FeLV (Collado et al., 2007; Lutz et al., 2009; de Mari et al., 2004; Doménech et al., 2011).

O estudo actual avaliou o efeito do tratamento com reFeIFN- ω em gatos infectados com FIV e/ou FeLV com sinais clínicos, em fase não terminal.

1. Sinais clínicos:

Após o tratamento com reFeIFN- ω 9/16 gatos melhoraram a sua avaliação clínica. A diferença entre os valores obtidos entre o Dia 0 e o Dia 65 foi estatisticamente significativa ($p=0,043$), sendo o grupo dos animais com FIV o que apresentou uma melhor resposta à terapêutica.

Os animais que mantiveram o valor da sua avaliação entre o Dia 0 e o Dia 65, tinham obtido uma classificação baixa ao Dia 0, ou seja, evidenciavam poucas afecções. Os gatos que se encontravam em piores condições antes do tratamento foram aqueles em que foi mais evidente a sua melhoria clínica.

No grupo do FeLV, no Dia 10 e no Dia 30, houve animais que pioraram o seu estado clínico consideravelmente, no entanto, tal facto pode ser justificado pelas más condições climáticas

que se sentiram nos dias anteriores à avaliação clínica e colheita de amostras, pelo incompleto isolamento dos gatis, para além da maior agressividade do FeLV ao nível do sistema imunológico (Hartmann et al., 2007).

As lesões localizadas a nível da cavidade oral, para além de constituírem os sinais clínicos mais comuns foram também os que apresentaram uma melhor evolução ao longo do tratamento. Os restantes sinais clínicos, de um modo geral, também baixaram a sua frequência e gravidade.

Em 2004, di Mari e colaboradores obtiveram resultados similares aos mencionados, descrevendo uma melhoria clínica e uma redução da taxa de mortalidade em gatos infectados com FeLV e co-infectados. Em 2011, Doménech e colaboradores, voltaram a corroborar estes resultados, concluindo que os animais em piores condições clínicas no início do tratamento com IFN- ω apresentavam uma melhor resposta à terapêutica.

O reFeIFN- ω parece ser eficiente no controlo dos sinais clínicos associados às infecções por FIV e FeLV, melhorando o estado hígido e assim a qualidade de vida dos gatos tratados.

2. Hematologia

O leucograma é de extrema importância na avaliação da doença provocada pelo FIV e pelo FeLV, já que os alvos destes vírus são exactamente as células do SI, induzindo uma imunodeficiência adquirida, aumentando assim o risco de desenvolvimento de infecções oportunistas, por diferentes agentes (Hartmann, 2011).

Enquanto o SI estiver operacional responde à infecção por agentes concomitantes induzindo um aumento do número de neutrófilos e, consequentemente, de leucócitos. Assim, numa fase inicial da infecção por FIV e FeLV o hemograma poderá ser normal ou demonstrar linfocitose ligeira (Sprague, TerWee & Woude, 2010).

Numa fase posterior da infecção, em que os linfócitos estão fortemente infectados e em que a diminuição de linfócitos Thelper faz com que todo o SI deixe de funcionar de um modo coordenado, o número de leucócitos, linfócitos e mesmo de neutrófilos pode apresentar-se diminuído (Hartman, 2011).

Em estudos efectuados por de Mari e colaboradores (2004) e Doménech e colaboradores (2011) são referidas melhorias a nível do leucograma, em gatos que inicialmente apresentavam valores fora do intervalo de referência. No actual estudo, a contagem de leucócitos e linfócitos foi, de modo geral, dentro do intervalo de referência, embora com pequenas oscilações, não valorizadas. Assim podemos concluir que o uso de reFeIFN- ω em gatos infectados com FIV e/ou FeLV não prejudica os parâmetros do hemograma, ao contrário de outros protocolos terapêuticos que combinam o interferão com antivirais (Lutz et al., 2009).

3. Análises bioquímicas

Ao longo do tratamento todos os gatos mantiveram valores de função renal e hepática dentro do intervalo de referência. Embora não exista informação disponível sobre uma possível indução de efeitos indesejados, não se pode excluir a possibilidade de ocorrência de perturbações auto-imunes nos animais tratados (Bula, Virbac). Estas perturbações podem incluir glomerulonefrites e hepatites, desta forma a Virbac recomenda especial precaução em animais que sofram de doença cardíaca, renal ou hepática, e os parâmetros correspondentes devem ser avaliados antes e durante o tratamento.

4. Proteinograma

O perfil do proteinograma é muito característico no caso de gatos infectados com FIV e/ou FeLV. Miró e colaboradores (2007) descreveram alterações significativas ao nível das proteínas totais, globulina- α_2 , globulina- γ e na razão albumina/globulinas. Conforme a combinação das alterações destes parâmetros pode-se, até certo ponto, caracterizar qual ou quais os retrovírus presentes (Miró et al., 2007). O aumento das proteínas totais e da globulina- γ são características dos animais infectados com FIV (Poli et al., 1992; Shelton, Linenberger, Persik and Abkowitz, 1995; Bendinelli et al, 1995; Miró et al., 2007) e co-infectados (Miró et al., 2007). A razão albumina/globulina está alterada nas infecções por FIV e nas infecções por FeLV, apresentando valores abaixo do intervalo de referência, como medida compensatória do aumento das globulinas (Miró et al., 2007). No caso do FeLV, a hiperglobulinémia- ω foi descrita por Hoover e colaboradores (2007), no entanto, Miró e colaboradores (2007) não obtiveram este resultado de um modo consistente. A hiperglobulinémia- 2α é característica da infecção por FeLV (Miró et al., 2007).

Neste estudo, no grupo do FIV, a média da concentração das proteínas totais esteve sempre aumentada ao longo do tratamento. A média da concentração das proteínas totais no grupo do FeLV e dos Co-Infectados teve resultados menos consistentes, variando entre valores normais e abaixo do intervalo de referência. No grupo do FeLV, a média da concentração das proteínas totais foi significativamente diferente entre o Dia 0 e o Dia 65 ($p=0,042$).

A concentração média da globulina- 2α esteve aumentada nos três grupos ao longo dos 65 dias de estudo. Já a concentração média da globulina- α_1 , no grupo FIV, no início do estudo teve valores abaixo dos valores de referência, no entanto, normalizou-os no Dia 30; a diferença da concentração média desta globulina entre o Dia 0 e o Dia 65 foi estatisticamente significativa ($p=0,048$). Os grupos FeLV e Co-Infectados tiveram valores entre o normal a inferior ao intervalo de referência. As globulinas α_1 e α_2 são proteínas da fase aguda da inflamação, e o seu aumento pode ser considerado um marcador de

infecções, neoplasias, traumas ou inflamações agudas dos tecidos (Duthie et al., 1997; Pocacqua et al., 2005; Miró et al., 2007).

A razão da concentração média albumina/globulinas manteve-se sempre dentro do intervalo de referência ao longo dos 65 dias nos três grupos estudados.

O grupo FeLV obteve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$) entre a concentração média da albumina no Dia 0 e no Dia 65.

Quanto às restantes imunoglobulinas apenas a hipoglobulina- β , no grupo FeLV, foi estatisticamente significativas entre o Dia 0 e o Dia 65 ($p=0,027$).

Uma hiperglobulinémia- γ foi sempre observada no grupo FIV, ao longo de todo o tratamento. Vários autores já documentaram o aumento das globulinas- γ em gatos SPF infectados com FIV (Hopper et al., 1989; Ackley, Yamamoto, Levy, Pederson and Cooper, 1990; Poli et al., 1992; Miró et al., 2007), sendo igualmente descrita noutras infecções por Lentivirus, como é o caso do HIV (Shirai, Cosentino, Leitman-Klinman and Klinman, 1992). Aparentemente, é uma resposta do SI (Amadori et al., 1989), pela hiperactivação dos linfócitos B, já que o seu número se mantém normal no sangue periférico (Ackley et al., 1990; Miró et al., 2007).

O aumento das globulinas- γ é, geralmente, observada em animais que foram infectados pelo FIV entre os 19 meses (Ackley et al., 1990; Hoffman-Lehmann et al., 1997; Miró et al., 2007) e os 56 meses (Hofmann-Lehmann et al., 1997; Miró et al., 2007). A normalização da globulina- γ após os 56 meses poderá representar uma fase mais avançada da infecção em que os linfócitos B deixam de ser tão estimulados devido à diminuição dos linfócitos Thelper (CD4+) que são indispensáveis para a activação e estimulação dos linfócitos B (Miró et al., 2007).

5. Provírus de FeLV

Tanto no grupo do FeLV como no grupo dos Co-Infectados nenhum gato negativou durante ou após o tratamento, mas 4/9 animais tratados reduziram a carga de provírus entre o Dia 0 e o Dia 65.

A diminuição de provírus implica a eliminação das células infectadas.

O interferão I ao ligar-se aos receptores celulares desencadeia uma sequência de acontecimentos que levam à activação da resposta imunitária (Sen, 2001) activando células do SI como células *Natural Killer* (NK), linfócitos Tcitotóxicos e macrófagos. Esta activação celular poderá induzir a apoptose das células infectadas (Samuel, 2001), contribuindo para a redução da carga de provírus.

É de referir que a classificação da avaliação clínica poderá estar correlacionada com os resultados de provírus de FeLV. Os animais que ao Dia 0 apresentavam um score mais baixo na avaliação clínica exibiam valores de provírus mais baixos. Do mesmo modo, os 4

gatos que diminuíram, ao dia 65, a carga de provirus de FeLV diminuíram, igualmente, a sua avaliação clínica; os gatos que mantiveram a carga proviral de FeLV ao longo do tratamento mantiveram igualmente a sua avaliação clínica. O único animal que aumentou a carga proviral de FeLV durante todo o tratamento, ao Dia 65, teve o valor máximo de provirus. O controlo do provirus de FeLV parece ser importante na manutenção do estado hígido dos gatos infectados.

6. Vírus concomitantes do tracto digestivo

A avaliação de agentes virais secundários na infecção por FIV e/ou FeLV é de extrema importância na análise dos efeitos do reFeIFN- ω , já que o FIV e o FeLV ao provocarem imunodepressão, tornam o animal mais susceptível à infecção por estes agentes (Hartmann, 2011).

Neste trabalho foi avaliada a presença de Parvovirus e a presença e quantificação de Coronavírus.

Apenas 1/16 gatos (grupo Co-Infectado) foi positivo a Parvovírus, no dia 0, tendo negativado no dia 10 e assim se manteve. Todos os restantes animais se mantiveram negativos durante o tratamento.

A presença de FCoV foi mais frequente. No Dia 0, 11/16 gatos foram positivos, no entanto, apenas 7/16 gatos se mantiveram positivos no Dia 65; destes 7 animais, 5 diminuíram a excreção viral.

A via oral/fecal é a mais relevante para a transmissão deste vírus (Foley, Poland, Carlson and Pederson, 1997). O número de gatos que convivem e partilham a mesma liteira é de extrema importância na epidemiologia desta virose (Foley, Poland, Carlson and Pederson, 1997). Nos nossos gatis a partilha de liteiras era frequente dentro de cada grupo podendo potenciar re-infecções. Algumas flutuações de carga viral foram observadas durante o tratamento. No entanto e apesar destas flutuações, ao D65 os valores de carga viral descenderam na maioria dos gatos em relação ao D0.

O interferão está documentado como possível agente terapêutico na peritonite infecciosa felina (PIF) (Ishida et al., 2004). No nosso estudo poderá ter contribuído para as reduções das cargas virais observadas.

CONCLUSÕES FINAIS

O reFeIFN- ω demonstrou a sua eficácia na melhoria dos sinais clínicos, na manutenção do hemograma dentro dos parâmetros normais e controlo dos vírus concomitantes. Os gatos infectados por FIV foram os que melhor responderam à terapêutica. Com base no perfil do proteinograma (Hoover et al, 2007; Miró et al., 2007) estes animais poderão encontrar-se numa fase assintomática desta doença.

Embora não exista cura para as infecções com FIV e/ou FeLV, o objectivo clínico é criar condições que visem a manutenção do estado hígido do animal o maior tempo possível antes do aparecimento dos sinais clínicos. As alterações observadas no proteinograma sugerem uma activação do sistema imunitário que poderá ter contribuído para uma melhoria dos sinais clínicos observados ao longo da terapêutica com reFeIFN- ω . O estado hígido em que o animal se encontra aquando do tratamento com o reFeIFN- ω é essencial, assim como a fase de doença, visto que a activação do sistema imunitário só é possível numa fase inicial de infecção (Miró et al., 2007).

No caso do FIV, a avaliação do proteinograma poderá revelar indicações sobre a fase da infecção apontando para o prognóstico expectável assim como para a possibilidade de sucesso na terapêutica.

A avaliação da carga viral plasmática (virémia) será importante para compreender o efeito do IFN- ω na fisiopatologia do FIV e FeLV. Estes resultados, em curso, permitirão compreender as variações provírus/ virémia neste.

Para além do que já foi referido, para uma melhor compreensão do efeito do reFeIFN- ω na fisiopatologia destas infecções por retrovírus será necessário estudar a variação da resposta imunitária ao longo do tratamento com reFeIFN- ω , para tal é necessário estudar as variações das concentrações de proteínas inflamatórias e de citocinas envolvidas na resposta imunitária celular e humoral e relacioná-las com as variações dos parâmetros clínicos analisados e a variação da carga viral plasmática e da proviral. Todos estes resultados estão em curso.

O reFeIFN- ω ao ter uma importância sobretudo a nível da modulação do sistema imunitário e sendo estas doenças muito dinâmicas, é possível que seja necessário repetir os tratamentos, não estando ainda determinada a frequência dos mesmos.

BIBLIOGRAFIA

- Ackley, C. D., Yamamoto, J. K., Levy, N., Pedersen, N. C., Cooper, M. D. (1990). Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 64: 5652-5655.
- Addie, D.D., Toth, S., Thompson, H., Greenwood, N., Jarret, J.O. (1998). Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Veterinary Record*, 142: 353-356.
- Addie, D. D., Jarrett, O. (2006). Feline Coronavirus Infections, In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Revised Reprint, 3rd ed., pp. 88-103. St Louis, Missouri: Saunders.
- Addie., D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C. (2009). Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7): 594-604.
- Amadori, A., R. Zamarchi, V. Ciminale, A. Del Mistro, S. Siervo, A., Alberti, M. Colombatti, L., Chieco-Bianchi, L. (1989). HIV-1-specific B cell activation. A major constituent of spontaneous B cell activation during HIV-1 infection. *Journal of Immunology*, 143: 2146-2152.
- Ammersbach, M., Bienzle, D. (2011). Methods for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification. *Immunology and Immunopathology*, 143 (3-4): 202-14.
- Bachmann, M.H., Mathiason-Rubard, C., Learn, G.H., Rodrigo, A.G., Sodora, D.L., Mazzetti, P., Hoover, E.A. & Mullins J.I. (1997). Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *The Journal of Virology*, 71: 4241-4253.
- Baneth, G., Kass, P.H., Steinfeld, D., Besser, M. (1999). A seroepidemiological study of Feline Coronavirus, Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 54: 39-43.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Mavaldi, G., & Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (1): 87-112.
- Battilani, M., Coradin, T., Scagliarini, A. Ciulli, S., Ostanello, F., Prosperi, S., Morganti, L. (2003). Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39 (2): 141-147.
- Biek, R., Rodrigo, A.G., Holley, D., Drummond, A., Anderson, J., Ross, C.R., Poss, H.A. (2003). Epidemiology, genetic diversity and evolution of endemic feline immunodeficiency virus in a population of wild cougars. *Journal Virology*, 77: 9578-9589
- Brennan, G., Podell, M.D., Wack, R., Kraft, S., Troyer, J.L., Bielefeldt-Ohmann, H., VandeWoude, S. (2006). Neurologic disease in captive lions (*Panthera leo*) with low-titer lion lentivirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4345-4352.
- Brown, E.W., Yuhki, N., Packer, C., O'Brien, S.J. (1994). A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus: epidemiologic and phylogenetic aspects. *Journal Virology*, 68: 5953-5968.
- Bull, M.E., Kennedy-Stoskopf, S., Levine, J.F., Loomis, M., Gebhard, D.G., Tompkins, W.A. (2003). Evaluation of T lymphocytes in captive Africa lions (*Panthera leo*) infected with feline immunodeficiency virus. *American Journal of Veterinary Research*, 64: 1293-1300.
- Carpenter, M.A., O'Brien, S.J. (1995). Coadaptation and immunodeficiency virus: lessons from the Felidae. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5: 739-745.
- Carpenter, M.A., Brown, E.W., Culver, M., Johnson, W.E., Pecon-Slattey, J., Brousset, D., O'Brien, S.J. (1996). Genetic and phylogenetic divergence of feline immunodeficiency virus in the puma (*Puma concolor*). *Journal Virology*, 70: 6682-6693.
- Collado, V.M., Doménech, A., Gómez-Lucía, E., Tejerico, G. & Corrales, G.M. (2006). Usos del interferon en la clínica de pequeños animales. *Pequeños Animales*, 63: 65-71.

- Collado, V.M., Gómez-Lúcia, E., Tejerico, G., Escolar, E., Martín, S. & Doménech, A. (2007). Effect of Type I interferons on the expression of feline leukemia virus. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.008.
- Collado, V.M., Doménech, A., Miró, G., Martín, S., Escolar, E., Gomez-Lucia, E. (2012). Epidemiological Aspects and Clinicopathological Findings in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus (FeLV) and/or Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Open Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 2, No. 1, pp. 13-20.
- Cotter, S.M. (1998). Feline viral neoplasia, in *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd ed., pp: 71-84, Philadelphia, Pennsylvania: Sanders.
- Courchamp, F., Pontier, D. (1994). Feline immunodeficiency virus: na epidemiological review. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 317: 1123-1134.
- Courchamp, F., Yoccoz, N.G., Artois, M., Pontier, D. (1998). At-risk individuals in feline immunodeficiency virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). *Epidemiology and Infection*, 121: 227-236.
- Cummins, J.M., Tompkins, M.B., Olsen, R.G., Tompkins, W.A., Lewis, M.G. (1988) Oral use of human alpha interferon in cats. *Journal of biological response modifiers*, 7: 513-523.
- Danner, R.M., Goltz, D.M., Hess, S.C., Banko, P.C. (2007). Evidence of feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and toxoplasma gondii in feral cats on Mauna Kea, Hawaii. *The Journal of Wildlife Diseases*, 43: 315-318.
- de Groot-Mijnes, J.D., van Dun, J.M., van der Most, R.G., de Groot, R.J. (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *Journal of Virology*, 79 (2):1036-44.
- de Marie, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B. & Eun H.-M. (2004). Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon-v on Feline Leukemia Virus (FeLV) -Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV) - Coinfected Symptomatic Cats. *Journal Veterinary International Medicine*, 18: 477-482.
- de Rozieres, S., Thompson, J., Sundstrom, M., Gruber, J., Stump, D.S., de Perseval, A.P., VandeWoude, S., Elder, J.H. (2008). Replication properties of clade A/C chimeric feline immunodeficiency viroses and evaluation of infection kinetics in the domestic cat. *Journal Virology*, 82: 7953-7963.
- DeBlois, R. W., Wesley, R. K. (1977). Sizes and concentrations of several type Concornaviruses and bacteriophage T2 by the resistive-pulse technique. *Journal of Virology*, 23 (2): 227-233.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C. (2005). Canineparvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 126 (1-2): 179-185.
- Doménech, A., Miró, G., Collado, V.M., Ballesteros, N., Sanjosé, L., Escolar, E., Martín, S., & Gomez-Lucia, E. (2011). Use of recombinant interferon omega in feline retrovirois: from theory to practice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi:10.1016/j.vetimm.2011.06.008.
- Duarte, A., Tavares, L. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*, 114 (1-2): 25-33.
- Duarte, A., Veiga, I., Tavares, L. (2009) Genetic diversity and phylogenetic analysis of Feline Coronavirus sequences from Portugal. *Veterinary Microbiology*, vol. 138, no.1-2, pp. 163-168.
- Dunham, S.P. & Graham, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 38: 879-901.
- Duthie, S., Eckersall, P. D., Addie, D. D., Lawrence, C. E., Jarrett, O. (1997). Value of a1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Veterinary Record*, 141: 299-303.
- Dye, C., Siddell, S. G. (2007). Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV1Je. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9 (3): 202-213.

- Foley, J.E., Poland, A., Carlson, J., Pedersen, N.C. (1997). Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210 (9): 1307-12.
- Gomes-Keller, M.A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2006). Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*, 112: 11-21.
- Gleich, S., Hartmann, K. (2009). Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus infected cats. *Journal Veterinary International Medicine*, 23: 552-558.
- Gleich, S.E., Krieger, S., Hartmann, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11: 985-992.
- Gomes-Keller, M.A., Gönczi, E., Grenacher, B., Tandon, R., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. (2009). *Veterinary Microbiology*, 134: 208-217.
- Hartmann, K., Stengel, S., Klein, D., Egberink, H., Balzarini, J. (2002). Efficacy of the chemokine receptor inhibitor 1,1'-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan against feline immunodeficiency virus infection. *Abstract, 6th International Feline Retrovirus Research Symposium*, Amelia Island, USA, 2002: 26.
- Hartmann K. (2005). FeLV treatment strategies and prognosis. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 27:14-26.
- Hartmann, K. (2006). Feline Leukemia Virus Infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Revised Reprint, 3rd ed., pp. 105-131. St Louis, Missouri: Saunders.
- Hartmann, K., Greissmayr, P., Schulz, B., Greene, C.E., Vidyashankar, N.A., Jarrett, O., Egberink, H.F. (2007) Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9: 439-445.
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143: 190-20.
- Hayward, J.J. (2009). Molecular epidemiology and evolution of feline immunodeficiency virus in the New Zealand domestic cat, *Felis catus*. PhD thesis, The University of Auckland, New Zealand.
- Hayward, J.J., Rodrigo, A.G. (2010). Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 134: 68-74.
- Herrewegh, A., de Groot, R., Cepica, A., Egberink, H., Horzinek, M., Rottier, P. (1995). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (3): 684-689.
- Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Ossent, P., Lutz, H. (1997). Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry and lymphocyte subsets. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4: 33-42.
- Hopper, C. D., Sparkes, A. H., Gruffydd-Jones, T. J., Crispin, S. M., Muir, P., Harbour, D. A., Stokes, C. R. (1989). Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Record*, 125: 341-346.
- Hosie, M.J., Robertson, C., Jarrett, O. (1989). Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 128: 293-297.
- Hosie, M.J., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7): 575-584.

- Huang, C., Conlee, D., Gill, M., Chu, H. (2010). Dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine provides 12 months of protective immunity against heterologous challenge. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 451-457.
- Ishida, T., Shibana, A., Tanaka, S., Uchida, K., Mochizuki, M. (2004). Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6: 107-109.
- Jarrett, W.F., Crawford, E.M., Martin, W.B. & Davie, F. (1964). A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature*, 202: 567-9.
- Kakinuma, S., Motokawa, K., Hohdatsu, T., Yamamoto, J.K., Koyama, H., Hashimoto, H. (1995). Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. *Journal Virology*, 69: 3639-3646.
- Knipe, D. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Straus, S. E., Howley, P. M., Martin, M. A., et al. (2007). *Virology*. (5th edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kummrow, M., Meli, M. L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N. C., Hofmann-Lehmann R, Lutz H. (2005). Feline Coronavirus Serotypes 1 and 2: Seroprevalence and Association with Disease in Switzerland. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12 (10): 1209-1215.
- Langhammer, S., Fiebig, U., Kurth, R., & Denner, J. (2005). Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine*, 23: 3341-3348.
- Langhammer, S., Hübner, J., Oswald, J., Kurth, R., Denner, J. (2011). Immunization with the transmembrane protein of a retrovirus, feline leukemia virus: absence of antigenemia following challenge. *Antiviral Research*, 89: 119-123
- Leutenegger, C.M., Klein, D., Hoffmann-Lehmann, R., Mislin, C., Hummel, U., Boni, J., Boretti, F., Guenzburg, W.H., Lutz, H. (1999). Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan® fluorogenic real-time detection system. *Journal of Virological Methods*, 78: 105-116.
- Levy, J.K (2000). Feline immunodeficiency virus update, in *Current Veterinary Therapy XIII*. pp. 284-291. Philadelphia: Saunders.
- Levy, J.K., Scott, H.M., Lachtara, J.L., Crawford, P.C. (2006). Seroprevalence of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228: 371-376.
- Lutz, H., Lehmann, R., Winkler, G., Kottwitz, B., Dittmer, A., Wolfensberger, C., Arnold, P. (1990). Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 132 (5): 217-25.
- Lutz, H., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline Leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11: 565-574.
- McCaw, D.L., Boon, G.D., Jergens, A.E., Kern, M.R., Bowles, M.H. & Johnson, J.C. (2001). Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37: 356-63.
- Miller, R.J., Cairns, J.S., Bridges, S., Sarver, N. (2000). Minireview: Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *Journal of Virology*, August 2000: 7187-7195.
- Miró, G., Doménech, A., Escolar, E., Collado, V.M., Tejerizo, G., De Las Heras, A., & Góme-Lucía, E. (2007). Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. *Journal of Veterinary Medicine*, 54: 203-209.
- Miyazawa, T., Tomonaga, K., Kawaguchi, Y., Mikami, T. (1994). The genome of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology*, 134: 221-234.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (1999) Parvoviridae. In *Veterinary Virology* (3rd ed., pp. 343-354). San Diego, California: An Imprint of Elsevier.

- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (não encontrei data). Retroviridae. In *Veterinary Virology* (3rd ed., pp. 363-388). San Diego, California: An Imprint of Elsevier.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. Coronaviridae. In *Veterinary Virology* (3rd ed., pp. 495-503). San Diego, California: An Imprint of Elsevier.
- Nakamura, K., Suzuki, Y., Ikeo, K., Ikeda, Y., Sato, E., Nguyen, N.T.P., Gojobori, T., Mikami, T., Miyazawa, T. (2003). Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Archives of Virology*, 148: 783-791.
- Nakamura, M., Sato, E., Miura, T., Baba, K., Shimoda, T., Miyazawa, T. (2010). Differential diagnosis of feline leukaemia virus subgroups using pseudotype viroes expressing green fluorescent protein. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6): 787-790.
- Nishimura, Y., Nakamura, S., Goto, N., Hasegawa, T., Pang, H., Goto, Y., Kato, H., Youn, H.Y., Endo, Y., Mizuno, T., Momoi, Y., Ohno, K., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A. (1996). Molecular characterization of feline immunodeficiency virus genome obtained directly from organs of a naturally infected cat with marked neurological symptoms and encephalitis. *Archives of Virology*, 141: 1933-1948.
- O'Connor, T.P., Tonelli, Q.J., Scarlett, J.M. (1991). Report of the National FeLV/FIV Awareness Project. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199: 1348-1352.
- Ostrowski, S., van Vuuren, M., Lenain, D.M., Durand, A. (2003). A serologic survey of wild felids from central west Saudi Arabia. *The Journal of Wildlife Diseases*, 39: 696-701.
- Pecorato, M.R., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Kawaguchi, Y., Sugita, S., Tohya, Y., Kai, C., Etcheverrigaray, M.E. & Mikami, T. (1996). Genetic diversity of Argentina isolates of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*, 77: 2031-2035.
- Pedersen, N., Ho E., Brown, M., Yamamoto, J. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science*, 235: 790-793.
- Pedretti, E., Passeri, B., Amadori, M., Isola, P., Di Pede, P., Telera, A., Vescovini, R., Quintavalla, F. & Pistillo, M. (2006). Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109: 245-254.
- Pesteanu-Somogyi, L. D., Radzai, C., Pressler, B. M. (2006). Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8: 1-5.
- Pistello, M., Conti, F., Vannucci, L., Freer, G. (2010). Novel approaches to vaccination against the feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134: 48-53.
- Pocacqua, V., Provasi, E., Paltrinieri, S., Gelain, E., Comunian, C., and Cecilian, F. (2005). Glycan moiety modifications of feline $\alpha 1$ -acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107: 17-26.
- Polani, S., Roca, A.L., Rosensteel, B.B., Kolokotronis, S., Bar-Gal, G.k. (2010). Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, 405: 398-407.
- Poli, A., Giannelli, C., Pistello, M., Zaccaro, L., Pieracci, D., Bendinelli, M, Malvaldi, G., (1992). Detection of salivary antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2038-2041.
- Prescott, L.M., Harley, J.P, Klein, D.A. (2005). The Viruses: Introduction and General Characteristics. In *Microbiology* (6th ed., pp. 346-366). Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers.
- Prescott, L.M., Harley, J.P, Klein, D.A. (2005). The Viruses: Viruses of Eucaryotes. In *Microbiology* (6th ed., pp. 383-394). Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers.
- Riondato, F., Gianella, P., Guglielmino, R., Cagnasso, A. & Bo, S. (2003). Effects of interferon alpha (INF-alpha) therapy on peripheral blood lymphocyte subsets from FIV and FeLV naturally infected cats. *Veterinary Research Communications*, 27: 429-432.
- Roelke, M.E., Pecon-Slaterry, J., Taylor, S., Citino, S., Brown, E., Packer, C., Vandewoude, S., O'Brien, S.J. (2006). T-lymphocyte profiles in FIV-infected wild lions and pumas reveal CD4 depletion. *The Journal of Wildlife Diseases*, 42: 234-248.

- Rosado, C.R. (2009). Rastreo Viroológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Samman, A., McMonagle, E.L., Logan, N., Willet, B.J., Biek, R., Hosie, M.J. (2011). Phylogenetic characterisation of naturally occurring feline immunodeficiency virus in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, 150 (3-4): 239-47.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferon. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 778-809.
- Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *The Annual Review of Microbiology*, 55: 255-81.
- Shelton, G.H., Waltier, R.M., Connor, S.C., Grant, C.K. (1989). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in pet cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 25: 7-12.
- Shelton, G. H., Linenberger, M. L., Persik, M. T., Abkowitz, J. L. (1995). Prospective hematologic and clinicopathologic study of asymptomatic cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9: 133-140.
- Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M., & Iwata, H. (2007). Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary Microbiology*, 124 (3-4): 348-352.
- Shirai, A., Cosentino, M., Leitman-Klinman, S. F., Klinman, D. M. (1992). HIV infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 89: 561-566.
- Sodora, D.L., Shaper, E.G., Kitchell, B.E., Dow, S.W., Hoover, E.A. & Mullins, J.I. (1994). Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *Journal Virology*, 68: 2230-2238.
- Soe, L.H., Devi, B.G., Mullins, J.I., Roy-Burman, P. (1983). Molecular cloning and characterization of endogenous feline leukemia virus sequences from a cat genomic library. *Journal of Virology*, 46 (3): 829-40.
- Sprague, W.S., Terwee, J.A. and Vandewoude, S. (2010). Temporal association of large granular lymphocytosis, neutropenia, proviral load, and FasL mRNA in cats with acute feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134: 115-121.
- Steed, V.P. (1987). Improved survival of four cats infected with feline leucemia virus after oral administration of interferon. *Feline Practice*, 17: 24-30.
- Steinrigl, A., Ertl, R., Langbein, I., Klein, D. (2010). Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134: 82-89.
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Meli, M.L., Golder, M.C., Lutz, H. & Hofmann-Lehman, R. (2005). Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 130: 124-132.
- Taylor, S.S., Tappin, S.W., Dodkin, S.J., Papasouliotis, K., Casamian-Sorrosal, D. & Tasker, S. (2010). Serum protein electrophoresis in 155 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 643-653.
- Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Horzinek M.C. (2009). Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7): 538-546.
- Weaver, E.A., Collisson, E.W., Slater, M. & Zhu, G. (2004). Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. *Journal Virology*, 78: 2158-2163.

- Weiss, R.C., Cummins, J.M., Richards, A.B. (1991) Low-dose orally administered alpha interferon treatment for feline leukemia virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199: 1477-1481.
- Winkler, I.G., Löchelt, M., Flower, R.L.P. (1999). Epidemiology of feline foamy virus and feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infection in domestic and feral cats: a seroepidemiological study. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2848-2851.
- Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, E.W., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R., Nakamura, R.M., Pedersen, N.C. (1989). Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194: 213-220.
- Zeidner, N.S., Myles, M.H., Mathiason-DuBard, C.K., Dreitz, M.J., Mullins, J.I. & Hoover, E.A., (1990). Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 1749-1756.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados dos exames clínicos dos gatos do grupo FIV realizados durante o tratamento.

	Gato 1	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 8	Gato 9	Gato 10
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 0							
Úlceras Orais/Gengivite	2	2	2	2	1	2	1
Granulomas Orais	2	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	2	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	2	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	2	0	0	0	2	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	0	0	1	1	0
TOTAL	13	2	2	3	7	5	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 10							
Úlceras Orais/Gengivites	2	2	2	2	1	2	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	2	0	0	0	2	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	1	0	0	0	1	1	0
TOTAL	10	2	2	3	7	5	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 30							
Úlceras Orais/gengivite	2	1	2	1	1	1	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	2	1	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	1	0	0	0	1	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	0	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	1	0	0	0	1	1	0
TOTAL	8	1	2	2	5	4	1
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 65							
Úlceras Orais/gengivite	1	0	2	1	1	0	1
Granulomas Orais	1	0	0	1	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	0	0	0	0	0	0
Corrimento nasal	1	0	0	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	1	0	0	0	0	0	0
Condição corporal	1	0	0	0	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0	0	0	0	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	0	0	1	1	0
TOTAL	6	0	2	2	2	2	1

Anexo 2: Resultados dos exames clínicos dos gatos do grupo FeLV realizados durante o tratamento.

	Gato 11	Gato 12	Gato 13	Gato 15	Gato 17	Gato 18
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 0						
Úlceras Orais/Gengivite	2	0	2	1	2	2
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	0	1
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	1	0	0	1
Corrimento nasal	0	1	1	0	0	2
Mucosas pálidas	0	0	0	0	0	1
Pêlo seco/seborreia	0	0	0	0	0	1
Condição corporal	0	2	0	0	0	1
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	2	0	1	0	2
TOTAL	2	5	6	2	3	11
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 10						
Úlceras Orais/Gengivites	2	0	2	1	2	2
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0	0	2	1
Linfadenomegália	0	0	0	0	1	0
Corrimento ocular	0	0	0	0	2	0
Corrimento nasal	0	1	1	0	2	2
Mucosas pálidas	0	0	0	0	1	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	0	0	1	1
Condição corporal	0	0	0	0	2	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	1	0	1	0	2
TOTAL	2	2	5	2	14	8
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 30						
Úlceras Orais/gengivite	2	0	1	1	2	2
Granulomas Orais	0	0	2	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	2	0	0	1
Linfadenomegália	0	0	0	0	0	0
Corrimento ocular	1	1	1	0	1	2
Corrimento nasal	1	1	1	0	1	2
Mucosas pálidas	0	0	0	0	1	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	1	0	1	1
Condição corporal	1	0	2	0	2	0
Consistência fecal	0	0	0	0	1	0
Palpação abdominal	0	0	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	0	0	0	0
TOTAL	5	3	11	2	9	8
AVALIAÇÃO CLÍNICA Dia 65						
Úlceras Orais/gengivite	1	Hospitalizado	1	1	0	2
Granulomas Orais	0	Hospitalizado	1	0	0	0
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	Hospitalizado	0	0	1	1
Linfadenomegália	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Corrimento ocular	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Corrimento nasal	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Mucosas pálidas	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Condição corporal	1	Hospitalizado	1	0	1	0
Consistência fecal	0	Hospitalizado	0	0	1	0
Palpação abdominal	0	Hospitalizado	0	0	0	0
Co-morbilidade	0	Hospitalizado	1	0	0	2
TOTAL	2		4	1	3	5

Anexo 3: Resultados dos exames clínicos dos gatos do grupo Co-Infetados realizados durante o tratamento.

	Gato 11	Gato 12	Gato 13
AVALIACAO CLÍNICA Dia 0			
Úlceras Orais/Gengivite	2	0	2
Granulomas Orais	0	0	2
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	0
Corrimento nasal	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	1
Condição corporal	0	1	0
Consistência fecal	0	0	1
Palpação abdominal	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	1
TOTAL	2	1	7
AVALIACAO CLÍNICA Dia 10			
Úlceras Orais/Gengivites	2	0	2
Granulomas Orais	0	0	2
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	0
Corrimento nasal	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	1
Condição corporal	0	1	0
Consistência fecal	0	0	1
Palpação abdominal	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	1
TOTAL	2	1	7
AVALIACAO CLÍNICA Dia 30			
Úlceras Orais/gengivite	2	0	1
Granulomas Orais	0	0	1
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	0
Corrimento nasal	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	1
Condição corporal	0	0	0
Consistência fecal	0	1	1
Palpação abdominal	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	1
TOTAL	2	1	5
AVALIACAO CLÍNICA Dia 65			
Úlceras Orais/gengivite	0	0	1
Granulomas Orais	0	0	1
Conjuntivite (uni/bilateral)	0	0	0
Linfadenomegália	0	0	0
Corrimento ocular	0	0	0
Corrimento nasal	0	0	0
Mucosas pálidas	0	0	0
Pêlo seco/seborreia	0	0	0
Condição corporal	0	1	0
Consistência fecal	0	0	0
Palpação abdominal	0	0	0
Co-morbilidade	0	0	1
TOTAL	0	1	3

Anexo 4: Resultados dos hemogramas dos gatos do grupo FIV realizados durante o tratamento.

	Gato 1	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 8	Gato 9	Gato 10
Dia 0							
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	7,57	5,93	9,91	7	9,68	8,74	9,43
Hematócrito [24-45%]	32,2	29,2	41,8	27,3	38,5	39	37,4
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	11	8,01	8,96	24,4	8,19	10,7	9,88
Neutrófilos [2500-12500]	8470	5050	5020	19770	6040	6420	7210
Linfócitos [1500-7000]	1540	2480	3410	3660	3310	3530	1880
Monócitos [0-850]	440	400	180	980	0	430	690
Dia 10							
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	5,01	6,03	7,04	5,94	8,17	7,94	9,6
Hematócrito [24-45%]	20,4	25	29,8	22,5	34,2	32	36,9
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	9,58	9,36	5,62	17,3	9,35	9,48	11,9
Neutrófilos [2500-12500]	6040	5900	4050	14710	5700	5024	9640
Linfócitos [1500-7000]	2970	2900	1180	1560	3090	3890	1790
Monócitos [0-850]	480	560	280	870	370	380	357
Dia 30							
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	6,49	6,53	7	5,76	7,26	12,5	9,27
Hematócrito [24-45%]	29,7	29,7	31,1	21,7	27,4	46,4	32,9
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	11,2	11,4	7,43	20,9	9,46	8,55	9,9
Neutrófilos [2500-12500]	9072	8322	4680	14630	5108	4617	7029
Linfócitos [1500-7000]	1680	2280	2303	45598	3879	3677	2277
Monócitos [0-850]	112	342	372	1045	378	257	396
Dia 65							
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	9,64	7,56	7,85	6,82	4,21	9,9	6,67
Hematócrito [24-45%]	34,2	31,9	36	30,4	20,7	36,1	30,6
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	12	12,3	9,29	12,3	12,6	9,9	16,9
Neutrófilos [2500-12500]	9960	667,89	4645	8733	9198	5049	13520
Linfócitos [1500-7000]	1320	520,29	3808,9	3321	2646	4356	2028
Monócitos [0-850]	120	27,06	743,2	246	504	297	1183

Anexo 5: Resultados dos hemogramas dos gatos do grupo FeLV realizados em 4 durante o tratamento.

	Gato 11	Gato 12	Gato 13	Gato 15	Gato 17	Gato 18
Dia 0						
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	7,25	9,13	6,62	8,41	5,86	7,85
Hematócrito [24-45%]	31,3	39,8	30,8	36,2	29,2	33
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	6,31	6,35	11,2	9,74	7,01	10,8
Neutrófilos [2500-12500]	4100	4570	6380	7110	4350	7580
Linfócitos [1500-7000]	1770	1330	4260	1950	2170	2268
Monócitos [0-850]	1130	1130	220	97	210	320
Dia 10						
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	6,03	5,27	7,02	8,01	3,24	7,57
Hematócrito [24-45%]	24	23,9	29,7	31,9	16,8	31,6
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	9,88	5,72	7,4	9,71	4,24	17,9
Neutrófilos [2500-12500]	7110	3490	3770	6990	3390	15570
Linfócitos [1500-7000]	2070	1890	3260	1460	640	1970
Monócitos [0-850]	690	320	370	970	80	358
Dia 30						
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	6,06	5,29	8,51	8,87	7,3	8,46
Hematócrito [24-45%]	27,1	24,4	31,7	37,3	35,9	31,7
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	21	14,5	8,86	17,9	10,7	13,2
Neutrófilos [2500-12500]	18270	10585	7353	14320	8667	10956
Linfócitos [1500-7000]	1890	3045	9638	2506	1605	1584
Monócitos [0-850]	840	580	88,6	895	107	132
Dia 65						
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	9,32	3,21	3,16	5,89	6,92	4,9
Hematócrito [24-45%]	36,5	33,9	17,8	20,6	31,8	20,2
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	23,8	12,4	3,19	21,1	12	5,07
Neutrófilos [2500-12500]	21658	8680	1595	14137	9960	3599,7
Linfócitos [1500-7000]	1666	2728	1435,5	4431	1320	1166,1
Monócitos [0-850]	476	620	159,5	210	120	253,5

Anexo 6: Resultados dos hemogramas dos gatos do grupo Co-Infetados realizados durante o tratamento.

	Gato 16	Gato 21	Gato 22
Dia 0			
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	12,6	10,1	8,45
Hematócrito [24-45%]	51,4	38	32,1
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	11	12,7	16,8
Neutrófilos [2500-12500]	7590	6860	10750
Linfócitos [1500-7000]	2090	3940	4540
Monócitos [0-850]	660	1020	340
Dia 10			
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	8,87	7,14	6,62
Hematócrito [24-45%]	37,3	26,4	28,3
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	15,1	7,48	18,9
Neutrófilos [2500-12500]	12680	4640	15690
Linfócitos [1500-7000]	1810	2540	2840
Monócitos [0-850]	450	75	380
Dia 30			
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	8,76	6,75	5,52
Hematócrito [24-45%]	37	31	22
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	10,1	8,44	16,3
Neutrófilos [2500-12500]	6363	7005	11899
Linfócitos [1500-7000]	3434	1013	3423
Monócitos [0-850]	101	844	652
Dia 65			
Eritrócitos [5-10x10 ⁶ /μL]	7,47	7,53	10,2
Hematócrito [24-45%]	33,1	28,2	44,2
Leucócitos [5,5 – 19,5x10 ³ /μL]	8,11	10,5	9,28
Neutrófilos [2500-12500]	4866	4593,3	5939,2
Linfócitos [1500-7000]	1703,1	2465	2876,8
Monócitos [0-850]	567,7	210	92,8

Anexo 7: Resultados dos proteinogramas dos gatos do grupo FIV realizados durante o tratamento.

	Gato 1	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 8	Gato 9	Gato 10
Albumina [2,1-4,0 g/dL]							
Dia 0	3,3	3,6	3,3	3	3,6	3	3,2
Dia 10	5,1	5	4,4	3,5	3,3	2,8	4,7
Dia 30	4,6	4,7	4,4	4,3	3,4	5,1	2,9
Dia 65	3,2	4,6	4,3	2,8	2,9	2,5	3,4
Globulina- α 1 [0,2-1,1 g/dL]							
Dia 0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0
Dia 10	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1
Dia 30	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0
Dia 65	0,9	0,3	0,3	0,2	0,1	0	0,1
Globulina- α 2 [0,4-0,9 g/dL]							
Dia 0	1,6	1,5	1,7	2,1	1,6	3,5	1,7
Dia 10	2,7	2,6	1,7	2,3	2	3,1	2,9
Dia 30	2,4	2,6	2	2,8	2,3	3	1,7
Dia 65	2,4	2,3	2,5	2,2	1,8	2,4	0,8
Globulina- β [0,9-1,9 g/dL]							
Dia 0	1,1	0,8	0,6	0,5	0,4	1,7	0,6
Dia 10	1,7	0,9	0,7	0,9	0,7	1,1	0,9
Dia 30	2,2	1,4	0,7	1,3	0,8	0,9	1
Dia 65	0,6	1,3	1,3	0,5	0,4	0,4	1,4
Globulina- γ [1,3-2,2 g/dL]							
Dia 0	3	2	2,8	3,9	2	3,3	2,7
Dia 10	4,4	3,9	3,4	3,8	2,3	2,8	4,3
Dia 30	4,5	3	3,8	4,8	2,3	2,4	2,4
Dia 65	3,3	3,5	3,2	4,3	2	2,3	2,7
Razão Albumina/Globulina [0,45-1,3]							
Dia 0	0,57	0,85	0,66	0,44	0,86	0,35	0,62
Dia 10	0,57	0,65	0,75	0,45	0,64	0,39	0,57
Dia 30	0,49	0,64	0,66	0,47	0,59	0,8	0,57
Dia 65	0,45	0,62	0,62	0,39	0,66	0,47	0,69
Proteínas Totais [5,7-7,9 g/dL]							
Dia 0	9	7,9	8,5	9,6	7,6	11,6	8,2
Dia 10	14	12,5	10,5	10,8	8,4	10	12,9
Dia 30	14	12	11,2	13,5	9	11,6	8
Dia 65	10,4	12	11,6	10	7,2	7,6	8,4

Anexo 8: Resultados dos proteinogramas dos gatos do grupo FeLV realizados durante o tratamento.

	Gato 11	Gato 12	Gato 13	Gato 15	Gato 17	Gato 18
Albumina [2,1-4,0 g/dL]						
Dia 0	3,5	4,5	3,3	2,3	4	3,7
Dia 10	4,3	3,3	4,6	4,7	5	4,2
Dia 30	1,8	3,2	1,1	3	2,8	4,3
Dia 65	1,6	2,7	2,2	2,8	2,8	2,7
Globulina- α 1 [0,2-1,1 g/dL]						
Dia 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Dia 10	0,3	0,1	0,2	0,6	0,3	0,3
Dia 30	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
Dia 65	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,4
Globulina- α 2 [0,4-0,9 g/dL]						
Dia 0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,5	2,2
Dia 10	2,8	2,4	2	2	2,3	3,3
Dia 30	1,6	0,7	0,5	1,7	3	2,1
Dia 65	1,7	1,4	1,7	1,5	1,3	1,6
Globulina- β [0,9-1,9 g/dL]						
Dia 0	0,4	0,7	0,5	0,9	0,8	0,7
Dia 10	0,9	0,9	0,9	1	0,8	1,3
Dia 30	0,5	1,5	0,2	0,6	1,1	0,5
Dia 65	0,3	0,6	0,3	0,4	0,4	0,5
Globulina- γ [1,3-2,2 g/dL]						
Dia 0	3	1,4	2,2	1,7	1,9	2,9
Dia 10	3,3	1,3	3,5	2,7	2,4	4,4
Dia 30	1,6	1,2	1,1	1,8	2,6	2,1
Dia 65	1,9	0,8	2,6	1,6	1,8	2,4
Razão Albumina/Globulina [0,45-1,3]						
Dia 0	0,65	1,07	0,81	0,59	0,88	0,62
Dia 10	0,6	0,72	0,69	0,75	0,85	0,44
Dia 30	0,52	0,9	0,58	0,69	0,42	0,9
Dia 65	0,4	0,97	0,46	0,77	0,84	0,56
Proteínas Totais [5,7-7,9 g/dL]						
Dia 0	9,2	8,8	7,5	8,4	8,4	9,6
Dia 10	11,6	8	11,2	11	10,8	13,5
Dia 30	5,6	6,8	8,4	7,2	9,6	9,2
Dia 65	5,6	5,6	6,8	6,4	6,4	7,6

Anexo 9: Resultados dos proteinogramas dos gatos do grupo Co-Infetados realizados durante o tratamento.

	Gato 16	Gato 21	Gato 22
Albumina [2,1-4,0 g/dL]			
Dia 0	4,8	4,8	3,6
Dia 10	4,6	4,9	4,8
Dia 30	3,1	4,7	5,7
Dia 65	2,5	2,7	3,6
Globulina- α 1 [0,2-1,1 g/dL]			
Dia 0	0,2	0,1	0,2
Dia 10	0,1	0,4	0,2
Dia 30	0	0,4	0,5
Dia 65	0	0,1	0,2
Globulina- α 2 [0,4-0,9 g/dL]			
Dia 0	2,5	2,5	1,5
Dia 10	2,4	2,9	3
Dia 30	2	2,8	3
Dia 65	1,6	1,8	2
Globulina- β [0,9-1,9 g/dL]			
Dia 0	0,8	1,3	0,9
Dia 10	0,9	0,9	1,2
Dia 30	0,65	1,3	0,8
Dia 65	0,3	0,8	1
Globulina- γ [1,3-2,2 g/dL]			
Dia 0	4,2	3,3	2,2
Dia 10	2,8	3,9	2,8
Dia 30	1,9	3,6	2,6
Dia 65	2	2,2	1,2
Razão Albumina/Globulina [0,45-1,3]			
Dia 0	0,62	0,64	0,78
Dia 10	0,74	0,63	0,67
Dia 30	0,65	0,59	0,83
Dia 65	0,6	0,57	0,83
Proteínas Totais [5,7-7,9 g/dL]			
Dia 0	12,5	12	8,4
Dia 10	10,8	13	12
Dia 30	7,6	12,8	12,6
Dia 65	6,4	7,6	8

Anexo 10: Resultados do teste estatístico de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do proteinograma nos 3 grupos de gatos (FIV, FeLV e Co-Infetados).

	G.alfa1.D65 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D65 - G.alfa2.D0	G.Beta.D65 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	RelA.G.D65 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z Asymp. Sig. (2- tailed)	-1,980 ^a ,048	-,254 ^a ,799	-,170 ^a ,865	-,271 ^a ,786	-,948 ^a ,343	-1,101 ^b ,271	-,931 ^a ,352

a. Based on negative ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Infecção = FIV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	G.alfa1.D65 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D65 - G.alfa2.D0	G.Beta.D65 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	RelA.G.D65 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z Asymp. Sig. (2- tailed)	,000 ^a 1,000	1,992 ^b ,046	1,363 ^b ,173	2,214 ^b ,027	1,577 ^b ,115	-1,363 ^b ,173	-2,032 ^b ,042

a. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Based on negative ranks.

d. Infecção = FeLV

e. Wilcoxon Signed Ranks Test

	G.alfa1.D65 - G.alfa1.D0	Alb.D65 - Alb.D0	G.alfa2.D65 - G.alfa2.D0	G.Beta.D65 - G.Beta.D0	G.Gama.D65 - G.Gama.D0	RelA.G.D65 - RelA.G.D0	Pts.D65 - PTs.D0
Z Asymp. Sig. (2- tailed)	1,000 ^a ,317	-1,342 ^a ,180	-1,069 ^a ,285	-1,089 ^a ,276	-1,604 ^a ,109	-,535 ^a ,593	-1,604 ^a ,109

a. Based on negative ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Infecção = FIV/FeLV

d. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 11: Resultado dos testes estatísticos de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do hemograma nos 3 grupos de gatos (FIV, FeLV e Co-Infetados).

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D65 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D65 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D65 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z Asymp. Sig. (2-tailed)	-,676 ^a ,499	-1,183 ^a ,237	-1,014 ^b ,310	-,507 ^a ,612	-,169 ^a ,866	-,169 ^b ,866

- a. Based on positive ranks.
b. Based on negative ranks.
c. Infecção = FIV
d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D65 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D65 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D65 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z Asymp. Sig. (2-tailed)	-1,153 ^a ,249	-1,572 ^a ,116	-,943 ^b ,345	-,314 ^a ,753	-1,363 ^b ,173	-2,201 ^a ,028

- a. Based on positive ranks.
b. Based on negative ranks.
c. Infecção = FeLV
d. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Eritrócitos.D65 - Eritrócitos.D0	Hematócrito.D65 - Hematócrito.D0	Leucócitos.D65 - Leucócitos.D0	Linfócitos.D65 - Linfócitos.D0	Neutrófilos.D65 - Neutrófilos.D0	Monócitos.D65 - Monócitos.D0
Z Asymp. Sig. (2-tailed)	-1,069 ^a ,285	-,535 ^a ,593	-1,604 ^a ,109	-1,604 ^a ,109	-1,604 ^a ,109	-1,604 ^a ,109

- a. Based on positive ranks.
b. Infecção = FIV/FeLV
c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 12: Resultado dos testes estatísticos de Wilcoxon para amostras emparelhadas para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos exames clínicos nos 3 grupos de gatos (FIV, FeLV e Co-Infetados).

Test Statistics^{b,c}

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-2,023 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043

a. Based on positive ranks.

b. Infecção = FIV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-1,826 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,068

a. Based on positive ranks.

b. Infecção = FeLV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

	Ex.Clinico.D65 - Ex.Clinico.D0
Z	-,447 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,655

a. Based on negative ranks.

b. Infecção = FIV/FeLV

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Anexo 13: Resultado dos testes estatísticos de Kruskal-Wallis com comparação múltipla das médias das ordens para avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do proteinograma entre os 3 grupos de gatos (FIV, FeLV e Co-Infectados).

Test Statistics^{a,b}

	G.alfa1.D0	Alb.D0	G.alfa2.D0	G.Beta.D0	G.Gama.D0	RelA.G.D0	PTs.D0
Chi-Square	8,053	5,842	1,385	2,763	4,036	1,598	2,778
Df	2	2	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,018	,054	,500	,251	,133	,450	,249

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Infecção

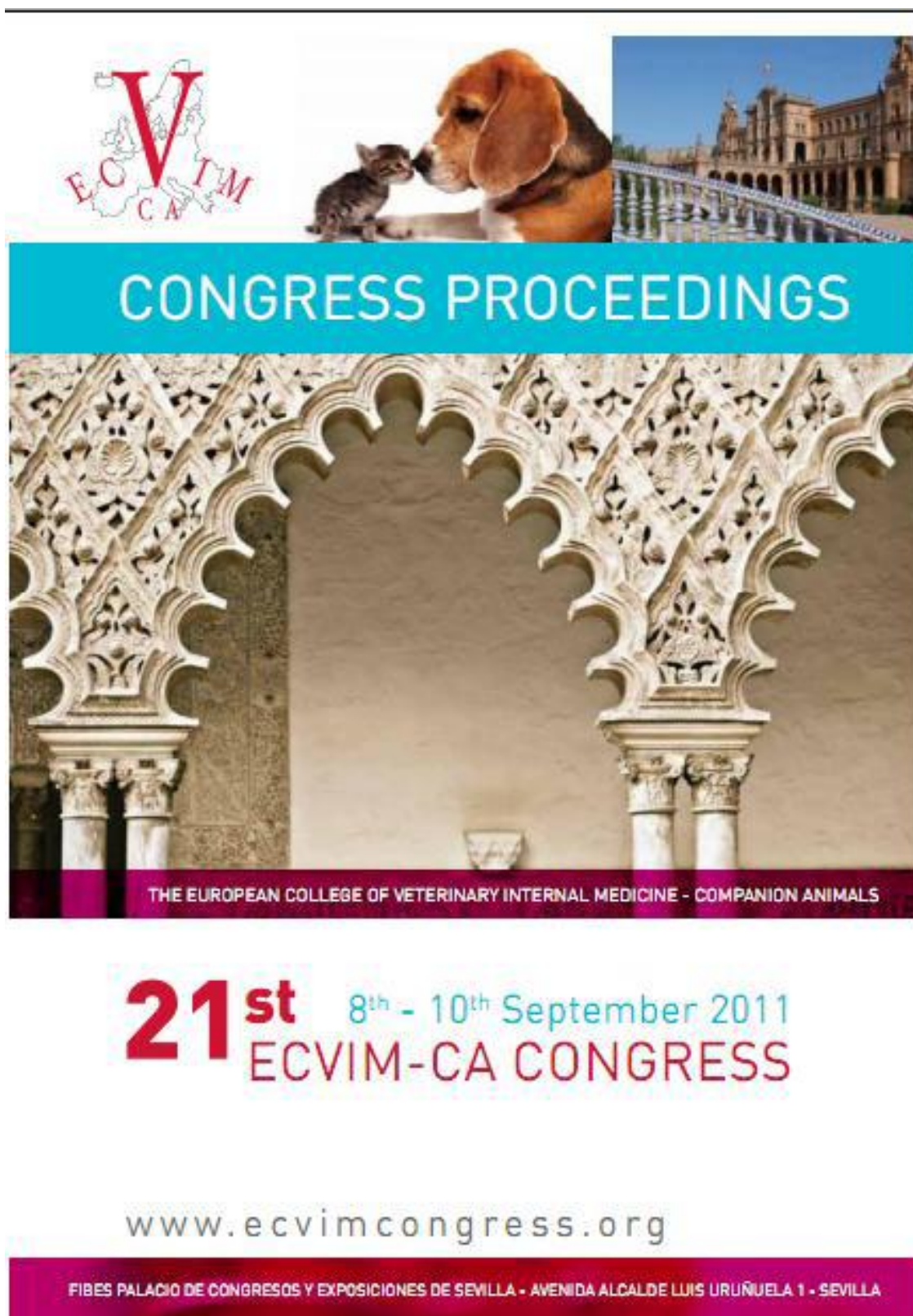
Multiple Comparisons

Rank of G.alfa1.D0

LSD

(I) Infecção	(J) Infecção	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
FIV	FeLV	-4,714286*	1,734994	,018	-8,46251	-,96606
	FIV/FeLV	-7,714286*	2,151995	,003	-12,36339	-3,06518
FeLV	FIV	4,714286*	1,734994	,018	,96606	8,46251
	FIV/FeLV	-3,000000	2,205139	,197	-7,76391	1,76391
FIV/FeLV	FIV	7,714286*	2,151995	,003	3,06518	12,36339
	FeLV	3,000000	2,205139	,197	-1,76391	7,76391

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



POSTER NO. FE-P-5
COMPLETE BLOOD COUNT (CBC), BIOCHEMISTRY AND SERUM PROTEIN PROFILE EVALUATION IN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS (FIV), FELINE LEUKEMIA VIRUS (FeLV) AND CO-INFECTED FELV/FIV CATS SUBMITTED TO FELINE IFN O (Fe-IFN O) THERAPY.

S. Gil¹, R. Leal¹, A. Duarte¹, N. Sepúlveda², D. McGahie³, I. Siborro¹, J. Cravo¹, C. Cartaxeiro¹, M. Niza¹, L. Tavares¹

¹CIISA/Faculty Veterinary Medicine Lisbon, LISBON, Portugal,
²London School of Hygiene and Tropical Medicine, LONDON, United Kingdom, ³Virbac, NICE, France

Retroviruses can induce immunodeficiency syndromes by distinct mechanisms leading to impairment of the immune system or to persistent chronic infection.

In order to evaluate how Fe-IFN alters the course of disease, 16 naturally infected retroviral cats (7 FIV, 6 FeLV and 3 co-infected) housed in a Lisbon Animal Shelter were followed during Fe-IFN therapy: 3 cycles of 5 injections at 1MU/kg SID SC (D0, D14 and D60). Clinical evaluation was assessed and blood samples were collected (D0, D10, D30, D65) to monitor cell line variations (CBC), hepatic enzymes (Alanine-transaminase, Aspartate-transaminase), renal function (Creatinine, Urea) and serum protein profile.

All cats had normal analytical profiles when beginning treatment. Red-blood cell counts did not change significantly in the majority of cats (15/16) during therapy. 14/16 cats maintained normal white-blood cell values while 2/16 cats presented a mild leukocytosis at D65. No changes of hepatic and renal function were observed during therapy.

Despite some mild variations, results revealed that Fe-IFN therapy does not seem to alter CBC values or the measured hepatic and renal parameters.

At D0, protein profile analysis revealed that FeLV and Co-infected cats had increased total proteins (TPs) with normal albuminemia, α 2-hypoglobulinemia, α 1- and β -hypoglobulinemia and a normal to increased gamma profile. FIV cats had a hyperproteinemia with normal albuminemia, α 2-hypoglobulinemia, α 1- and β -hypoglobulinemia and a consistent γ -hypoglobulinemia.

Kruskal-Wallis analysis revealed statistically significant differences that were discriminated by pairwise comparison. The γ -globulins were significantly lower in FIV cats at D0 in comparison to FeLV and co-infected cats ($p < 0.05$). Most relevantly, γ -globulins and TPs decreased in most FeLV and co-infected cats during Fe-IFN therapy (D30 and D65). FIV cats, by comparison, presented higher levels at the end of the treatment than at the beginning.

Differences in the initial and final levels of γ -globulins in FeLV and FIV cats are relevant. Enhancement of γ -globulins is described in retrovirus infections. Actually, increased levels of γ -globulins in FIV infected cats after Fe-IFN therapy could be due to the induction of neutralizing antibodies which are found to be effective in the cat immune response against FIV. Conversely reduction of γ -globulins observed in FeLV cats could be a strong indicator of the benefits of Fe-IFN therapy. In order to deepen this knowledge, cellular and humoral related cytokines need to be quantified and correlated to globulin levels.



INTERFERON- ω THERAPY ON FELINE IMMUNODEFICIENCY AND LEUKEMIA INFECTED STRAY CATS: CLINICAL IMPROVEMENT AND CONTROL OF CONCOMITANT VIRAL EXCRETION

Solange Gil Rodolfo Leal Ana Duarte David McGahie Inês Siborro Joana Cravo Clara Cartaxeiro Maria Niza² Luís Tavares

CIISA, Faculty Veterinary Medicine Lisbon, Portugal ² Virbac, Nice, France

Objectives of the Study::

FIV and FeLV viruses are common infectious agents in stray cats and shelter environments. In Veterinary Medicine, therapy is based on immunostimulating drugs such as IFN inducers or IFNs (Human IFN α /Feline IFN ω) (1). Although Human IFN α is currently used, its frequent administration leads to development of antibodies, undermining continuous administration (2). Recently developed Fe-IFN ω has shown an antiviral action "in vitro" not only against FIV and FeLV but also against feline herpesvirus (3) and calicivirus (4). In order to clarify the improvement of clinical signs in cats naturally infected or co-infected with FIV/FeLV and to correlate this improvement with reduced excretion of concomitant virus, cats naturally infected with FIV/FeLV were followed during Fe-IFN ω therapy.

Materials and Methods:

Eighteen stray cats, housed in a Lisbon Animal Shelter and indicated as retroviral infected were tested for FIV and FeLV (ELISA). Positive cats (16/18: 7/16 FIV, 6/16 FeLV and 3/16 co-infected) were tested for Herpesvirus (QRT-PCR), Calicivirus (PCR) (5) and Coronavirus (QRT-PCR). 2/18 cats were negative for retrovirus and excluded from therapy. Cats received Fe-IFN ω using the licensed protocol (6): 5 injections, 1MU/kg SC SID (Day 0, Day 14, Day 60). At D0, D10, D30 and D65 all cats were submitted to regular clinical evaluations and samples collected for quantification of concomitant virus excretion. At D65, all cats were re-tested for FIV and FeLV.

Results:

ELISA re-testing showed that all FIV cats remained positive while 1 FeLV cat tested negative. Calicivirus prevalence was 14/16 (5/7 FIV, 6/6 FeLV and 3/3 Co-infected) at D0 and from D10 to D65 all the animals tested negative. Coronavirus viral loads at D0 showed 11/16 positives (5/7 FIV, 4/6 FeLV and 2/3 Co-infected) which decreased in 4/5 FIV cats, 3/4 FeLV cats and in all Co-infected cats. 11/16 were Herpesvirus positive at D0 (4/7 FIV, 5/6 FeLV and 2/3 Co-infected). Its viral excretion during therapy is under current analysis.

Clinical evaluation revealed that 10/16 cats improved their clinical signs with Fe-IFN ω therapy (5/7 FIV, 3/6 FeLV and 2/3 co-infected) while 6/16 remained stable during treatment.

Conclusions:

In conclusion, Fe-IFN ω therapy is helpful in the improvement of clinical signs in FIV and FeLV Co-infected cats and it is particularly relevant in the control and decrease of concurrent viral excretion namely Calicivirus and Coronavirus.

Bibliography:

- (1) Hosie, M.J., et al., Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg, 2009. 11(7): p. 575-84.
- (2) Zeidner, N.S., et al., Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. Antimicrob Agents Chemother, 1990. 34(9): p. 1749-56.
- (3) Bracklein, T., et al., Activity of feline interferon-omega after ocular or oral administration in cats as indicated by Mx protein expression in conjunctival and white blood cells. Am J Vet Res, 2006. 67(6): p. 1025-32.
- (4) Radford, A. D., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Thiry, E., Truyen, U. and Horzinek, M. C., Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine & Surgery Volume 11, Issue 7, July 2009, Pages 556-564
- (5) Wilhelm, S. and U. Truyen, Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect a broad range of feline calicivirus isolates. Journal of Virological Methods, 2006. 133(1): p. 105-108.
- (6) de Mari, K., et al., Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. J Vet Intern Med, 2004. 18(4): p. 477-82.